



Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la malignité des phéochromocytomes et des paragangliomes SDHB-dépendants

Céline Lorient

► To cite this version:

Céline Lorient. Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la malignité des phéochromocytomes et des paragangliomes SDHB-dépendants. Biologie moléculaire. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. <NNT : 2014PA05T014>. <tel-01127001>

HAL Id: tel-01127001

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01127001>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

ANNÉE 2014

THÈSE DE DOCTORAT

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

ÉCOLE DOCTORALE : GÉNÉTIQUE, CELLULE, IMMUNOLOGIE, INFECTIOLOGIE, DÉVELOPPEMENT

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT PAR

CÉLINE LORIOT

**ÉTUDE DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES
RESPONSABLES DE LA MALIGNITÉ DES PHÉOCHROMOCYTOMES
ET DES PARAGANGLIOMES *SDHB*-DÉPENDANTS**

LE 30 JUIN 2014

Devant le Jury composé de :

Pr Pierre-François PLOUIN

Dr Enzo LALLI

Dr Stéphane ANSIEAU

Dr Catherine MONNOT

Pr Michaela FONTENAY

Pr Anne-Paule GIMENEZ-ROQUEPLO

Dr Judith FAVIER

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Membre invité

Comme le temps passe, j'ai l'impression qu'hier encore j'espérais de toutes mes forces avoir la chance de faire une thèse, et aujourd'hui me voilà en train de l'écrire !

Je voudrais commencer par prendre le temps de remercier toutes les personnes qui de près ou de loin font qu'aujourd'hui j'en suis arrivée là. A vous tous un très grand MERCI, parce que sans votre soutien, votre aide et votre confiance j'aurais pu changer de voie, ne pas avoir le courage ou encore abandonner.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Professeur Plouin d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Messieurs Stéphane Ansieau et Enzo Lalli, merci d'avoir accepté d'examiner et de juger mon travail de thèse à travers ce manuscrit. Enfin merci à Mesdames Catherine Monnot et Michaela Fontenay de faire partie de mon jury de thèse.

Anne-Paule, Judith, un très grand merci à vous deux, évidemment ! Vous avez eu confiance en la petite étudiante que j'étais, vous avez accepté de m'accueillir dans votre laboratoire pour mon Master dans un premier temps puis pour faire une thèse ensuite. Sans vous je n'en serai indéniablement pas là aujourd'hui, alors très sincèrement MERCI. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir donné la chance de travailler sur un projet passionnant, de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenue et aidée pour en arriver là aujourd'hui. Merci d'avoir pris le temps de corriger encore et encore mon manuscrit, j'imagine le travail que cela représente et je vous en remercie. Une pensée plus particulière pour toi Judith, que j'ai probablement bien plus embêtée au quotidien !! Merci pour ta disponibilité, pour ton écoute et pour tes conseils, pour ton enthousiasme et ta bonne humeur. Merci d'avoir continué depuis chez toi, malgré ton congé, les corrections multiples de ma thèse et de mon papier. Merci pour tout, tout simplement !

Un grand merci à toutes celles et ceux qui rendent la vie si agréable au labo au quotidien, je mesure la chance d'avoir pu passer presque 5 ans dans un labo où pas une seule fois je ne suis venue à reculons. Particulièrement à tous les membres de l'ex grande Équipe 3, un grand merci. C'est un réel plaisir de travailler au PARCC en votre compagnie à tous : Bettina, Christelle, Colette, Éric, Erika, Estelle, Fabio, Francesco, Isabelle, Juliette, Maria-Christina, Marine, Nabila, Nikita, Romuald, Sheerazed, Sonia, Xavier. Je pense également ici à celles et ceux qui se sont déjà envolés vers d'autres horizons, mais qui ont fait un passage par l'U970 : Amanda, Benoit, Cara, Maëlle, Rénette, Weiwei.

Un grand merci tout spécial pour Catherine, dont l'aide et la gestion au quotidien nous permettent de travailler dans des conditions idéales ! Et au-delà de ça merci pour ta sympathie et pour ta bonne humeur.

Un merci particulier à l'Équipe 13, passée et présente. Merci à tous pour vos discussions et suggestions, pour votre aide et votre soutien. Ce chiffre nous porte bonheur j'en suis certaine, cette équipe est réellement formidable : Anne-Paule, Judith, Nelly, Mélanie, Charlotte, Aurélie, Luis, Maëva, Emmanuel, sans oublier les anciens (et anciennes) Constance, Noémie, Cosimo, Julie, An Tach, Alexandre, Nasséra, Alexis, un grand MERCI à tous.

Un petit clin d'œil aux occupant(e)s, de ce qui fut pendant longtemps le bureau des étudiantes : Emilie, Edwige, Emmanuelle, Laurence, Sabrina, Constance, Charlotte ce bureau n'aurait jamais été le même sans vous ! Un grand merci pour tous ces moments partagés dans ce petit espace (pas si petit), fous-rire, déprime passagère, joie de la manip qui marche, dépression de la manip qui ne marche pas,

coups de gueule, bureau des pleurs, salle de pause, grandes annonces, ... tout y est passé je pense ! Que de souvenirs avec vous, MERCI.

Un petit clin d'œil spécial à vous les filles : Mélanie, Hélène, Sabrina, Julie, Claire. Être co-thésardes avec vous fut plus qu'un plaisir !! C'est avec de vraies amies que je repars. Merci infiniment pour votre présence à tous les moments de ma vie pendant ces 5 ans, aussi bien en ce qui concerne la thèse que le reste, au labo et surtout à l'extérieur. MERCI LES FILLES.

Adeline, Mélanie, François Fabien, on n'y croyait pas forcément et puis finalement nous y voilà ! Un grand merci à vous aussi, mes chers compagnons de fac devenus compagnons de thèse ! Merci pour votre présence, pour votre amitié, pour toutes nos soirées, tous les moments partagés, toutes les discussions sur notre avenir, sur la recherche, sur la vie en général ... (il y en a eu beaucoup !). Merci à vos moitiés respectives, et pardon d'avoir dû supporter toutes ces discussions sur la recherche, notre avenir ... !!! Julien, Freddy, Ludovica, Charlotte, merci de votre soutien ! Merci à vous d'avoir été là à toutes ces étapes importantes, et merci d'avance pour les suivantes où je sais que je pourrais compter sur vous !

Je voudrais également adresser mes remerciements à ceux qui me sont encore plus proches, sans qui je ne serai pas celle que je suis. A mes parents, Papa, Maman merci infiniment, pour tous ce que vous avez toujours fait pour nous, merci d'avoir cru en moi depuis toutes ces années, merci d'avoir tout fait pour que je puisse réaliser mes rêves (écrire ces quelques lignes aujourd'hui est le signe que j'en ai réalisé un), merci de m'avoir laissé faire mes propres choix et d'y avoir cru avec moi, de m'avoir soutenue : MERCI POUR TOUT ! A mon frère et à mes sœurs, Gérémy, Cindy, Virginie, depuis le temps que je vous répète que je veux faire de la recherche, finalement j'ai un peu réussi non ?! Merci à vous, pour votre aide, votre soutien et pour votre présence tout simplement.

Enfin, mes derniers remerciements sont pour toi Alejandro. I would like to thank you for everything. Thank you for having entered in my life when I definitively needed it. Thank you for your understanding, for your time, your support and your help. Thank you for believing so hard in me, much more than I do. And finally, thank you for your love.

*Cette thèse a été réalisée au sein de l'unité Inserm U970,
Au Centre de Recherche Cardiovasculaire de l'hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP)
Situé au 56 rue Leblanc, Paris*

RÉSUMÉ

Les phéochromocytomes (PCC) et les paragangliomes (PGL) sont des tumeurs neuroendocrines rares, pour lesquelles le déterminisme génétique est très important, avec 16 gènes de prédisposition identifiés à ce jour. Au cours de ce travail de thèse, je me suis plus particulièrement intéressée aux conséquences des mutations du gène *SDHB*, car il avait été préalablement démontré qu'elles constituaient un facteur de risque de mauvais pronostic, associé à un phénotype métastatique et à une réduction de la survie des patients.

Grâce à l'analyse du transcriptome d'une large cohorte de 188 échantillons de PCC/PGL humains, j'ai pu mettre en évidence que la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) était spécifiquement activée dans les tumeurs métastatiques *SDHB*-dépendantes. En effet, j'ai observé, dans ce sous-groupe de tumeurs, une surexpression de facteurs de transcription et de régulateurs précoces de l'EMT, comme *TWIST1*, *TFC3*, ou *LOXL2* ; une perte d'expression de marqueurs de jonctions cellulaires, comme *CDH2* et *KRT19* ; ou encore une induction de gènes codant pour des enzymes pro-invasives, comme *MMP1* et *MMP2*. Dans ces tumeurs, j'ai par ailleurs validé l'induction transcriptionnelle de l'EMT en mettant en évidence la rétention nucléaire de la protéine SNAIL (un facteur de transcription clé de l'EMT) sur des coupes de tissus. Dans cette même cohorte, l'analyse des données de méthylation globale de l'ADN nous a permis d'observer un phénotype hyperméthylateur dans les tumeurs *SDHx*, qui est expliqué par une inhibition de déméthylases de l'ADN et des histones par le succinate, qui s'accumule dans ces tumeurs où la succinate déshydrogénase est inactivée. Nous avons ainsi pu démontrer que le succinate est un oncométabolite qui induit des modifications épigénétiques impliquées dans l'extinction de nombreux gènes, et en particulier des gènes associés à l'EMT, comme le gène *KRT19* (l'un des plus hyperméthylés dans les tumeurs *SDHB*-malignes, comparativement aux autres). J'ai ensuite caractérisé le premier modèle cellulaire de PCC/PGL porteur d'une inactivation complète du gène *Sdhb*, dans lequel j'ai confirmé l'activation de l'EMT, au niveau transcriptionnel et au niveau protéique. La caractérisation fonctionnelle de ces cellules m'a ensuite permis de mettre en évidence des propriétés migratoires, invasives, et adhésives spécifiques des cellules chromaffines *Sdhb*^{-/-}. J'ai par la suite focalisé mon étude sur le gène *Krt19*, qui code pour une protéine du cytosquelette, la kératine 19 et qui est éteint dans les tumeurs et dans les cellules *Sdhb*^{-/-}. La réintroduction de ce gène dans les cellules *Sdhb*^{-/-} et son inhibition dans les cellules sauvages m'ont permis de conclure à l'implication de la kératine 19 dans les processus d'adhésion, de migration et d'invasion. Cependant je n'ai pas pu expliquer l'ensemble du phénotype par la seule modulation de ce gène, ce qui démontre l'implication d'autres acteurs dans la mise en place du phénotype invasif décrit.

Mes travaux de thèse ont ainsi permis de démontrer que l'activation de l'EMT est responsable du caractère métastatique et invasif observé dans les tumeurs porteuses d'une mutation sur le gène *SDHB* et que cette activation est notamment secondaire aux modifications épigénétiques induites par l'inactivation de la succinate déshydrogénase.

Mots clés :

PCC/PGL – SDHB – Malignité – EMT – KRT19

ABSTRACT

Pheochromocytomas (PCC) and paragangliomas (PGL) are rare neuroendocrine tumors for which there is a major impact of genetic determinism with 16 identified predisposition genes to date. During this PhD training, I was particularly interested in the consequences of *SDHB* gene mutations because it was previously demonstrated that they constitute a high risk factor of poor prognosis, associated with metastatic phenotype and reduced survival.

During my thesis, thanks to the analysis of transcriptomic data of a large cohort of 188 human PCC/PGL samples, I identified epithelial to mesenchymal transition (EMT) as activated in *SDHB*-metastatic tumors. Indeed, I observed a transcriptional induction of *TWIST1*, *TCF3* and *LOXL2*, which are transcription factors or early regulators of EMT; a loss of expression of cellular junction components such as *CDH2* and *KRT19*; and an up regulation of genes encoding pro-invasive proteases, such as *MMP1* and *MMP2*. In these tumors, I validated the transcriptional induction of EMT by showing a nuclear retention of SNAIL protein, the master EMT transcription factor. In the same cohort, global DNA methylation data allowed us to describe a hypermethylator phenotype in *SDHx* related tumors, explained by the inhibition of DNA and histones déméthylases by succinate, which accumulates massively in cells inactivated for succinate dehydrogenase. We thus demonstrated that succinate is an oncometabolite responsible for epigenetic modifications implicated in gene extinction, including EMT-related genes such as *KRT19* (one of the most hypermethylated genes in *SDHB*-metastatic samples). Following these observations, I characterized the first PCC/PGL cellular model displaying a complete *Sdhb* inactivation, in which I confirmed EMT activation, at transcriptional and protein levels. Functional characterization of these cells allowed me to show *Sdhb*-specific migratory, invasive and adhesive properties. I thus focused my study on *Krt19*, which encodes keratin 19, a cytoskeleton protein, lost in *Sdhb*^{-/-} cells and in human *SDHB*-related tumors. *Krt19* rescue in *Sdhb*^{-/-} cells or *Krt19* inhibition in wild-type cells allowed me to conclude that keratin 19 is implicated in adhesion, migration and invasion. However I was not able to explain the whole phenotype observed, demonstrating the implication of other actors in the establishment of the invasive phenotype.

The main result of my PhD work is the discovery that EMT is a molecular pathway responsible for the metastatic and invasive phenotype observed in *SDHB*-mutated tumors as a result of epigenetic alterations due to succinate dehydrogenase inactivation.

Keywords:

PCC/PGL – *SDHB* – Malignancy – EMT – *KRT19*

A mes parents,

A ma marraine

RESUME	7
ABSTRACT	9
LISTE DES ABREVIATIONS	19
PREAMBULE	23
 INTRODUCTION GENERALE	 25
I. PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES	25
1. DEFINITIONS	25
2. ORIGINE EMBRYONNAIRE	25
A. Les cellules de la crête neurale	25
B. Le système nerveux autonome	26
a. Le système nerveux sympathique	27
b. Le système nerveux parasympathique	28
c. Cas particulier de la médullosurrénale	29
3. CARACTERISTIQUES CLINIQUES / SYMPTOMATOLOGIE	29
A. Cas des tumeurs sécrétantes	29
B. Cas des tumeurs non fonctionnelles	29
4. DIAGNOSTIQUER LES PCC ET LES PGL	30
A. Diagnostic biochimique	30
a. Métabolisme des catécholamines	30
b. Les différents profils sécrétoires	31
c. Dosages biochimiques	31
B. Imagerie	32
C. Diagnostic histologique	34
5. MALIGNITE	35
A. Définition	35
B. Critères de malignité	35
a. Critères anatomo-pathologiques	35
b. Marqueurs histologiques	37
<i>Marqueurs associés à la croissance et prolifération</i>	40
<i>Marqueurs associés à l'inhibition de la croissance et de l'apoptose</i>	40
<i>Marqueurs associés à l'angiogenèse</i>	41
<i>Marqueurs associés à l'invasion</i>	42
c. Dosages biologiques	43
d. Autres	44
<i>Altérations génomiques</i>	44
<i>Micro-ARNs</i>	44
6. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE	45
A. La chirurgie	45

B.	La radiothérapie métabolique	46
C.	La chimiothérapie	46
D.	Autres	47
7.	GENETIQUE DU PHEOCHROMOCYTOME/PARAGANGLIOME	47
A.	Les présentations syndromiques	48
a.	La neurofibromatose de type 1	48
	<i>Caractéristiques cliniques</i>	48
	<i>Gène associé à la pathologie</i>	49
	<i>Protéine codée par le gène NF1</i>	49
b.	La néoplasie endocrinienne multiple de type 2	50
	<i>Caractéristiques cliniques</i>	50
	<i>Gène associé à la pathologie</i>	51
	<i>Protéine codée par le gène RET</i>	51
c.	La maladie de von Hippel-Lindau	52
	<i>Caractéristiques cliniques</i>	52
	<i>Gène associé à la pathologie</i>	53
	<i>Protéines codées par le gène VHL</i>	53
B.	Les présentations non syndromiques	54
a.	Les PCC/PGL héréditaires SDHx-dépendants	54
	<i>Gènes associés à la pathologie</i>	54
	<i>Protéines codées par les gènes SDHx</i>	57
b.	Les PCC/PGL héréditaires FH-dépendant	59
	<i>Gène associé à la pathologie</i>	59
	<i>Protéine codée par le gène FH</i>	60
c.	Les phéochromocytomes familiaux	60
	<i>Gènes associés à la pathologie</i>	60
	<i>Protéines codées par les gènes TMEM127 et MAX</i>	61
C.	Les mutations exceptionnelles	61
a.	KIF1B β	61
b.	PHD2	62
c.	IDH1	62
d.	Bilan	63
D.	Cas des mutations HIF2A	63
E.	Cas des mutations H-RAS	63
F.	Test génétique	64
8.	TUMORIGENESE DES PCC/PGL	65
A.	La pseudo-hypoxie	66
B.	Prolifération et survie cellulaire	67
C.	La voie de l'apoptose PHD3-dépendante	68
D.	Thérapies ciblées	69
II.	LE CAS PARTICULIER DU GÈNE SDHB	71
1.	UN FACTEUR DE MAUVAIS PRONOSTIC	71

2.	PARTICULARITES DES TUMEURS <i>SDHB</i> -DEPENDANTES	72
A.	Localisation	72
B.	Profil sécrétoire	72
C.	Spécificités à l'imagerie	73
III.	LA TRANSITION ÉPITHÉLIO-MÉSENCHYMATEUSE ET L'ÉCHAPPEMENT TUMORAL	75
1.	CONCEPT GENERAL : LES TRANSITIONS EPITHELIO-MESENCHYMATEUSES	75
A.	Les EMT physiologiques	75
a.	Développement embryonnaire, morphogenèse et organogenèse	75
	<i>Gastrulation</i>	75
	<i>Crêtes neurales</i>	76
	<i>Métamérisation et formation de somites</i>	77
	<i>Formation du cœur</i>	77
	<i>Tractus génital masculin</i>	78
	<i>Bilan</i>	79
b.	Régénération tissulaire et cicatrisation	80
c.	Cas particulier de l'épithélium ovarien	80
B.	Les EMT pathologiques	81
a.	Fibrose tissulaire	81
b.	Progression tumorale	82
2.	SIGNALISATION MOLECULAIRE DE L'EMT AU COURS DE LA PROGRESSION TUMORALE	82
A.	Les signaux extracellulaires	83
a.	Le TGFβ	83
b.	Les récepteurs à activité tyrosine kinase	84
c.	Autres	84
d.	L'hypoxie	84
e.	Récapitulatif	84
B.	Les inducteurs d'EMT	85
a.	SNAILS	85
	<i>Structure</i>	85
	<i>Régulation post-traductionnelle</i>	86
b.	ZEBs	88
	<i>Structure</i>	88
	<i>Régulation post-traductionnelle</i>	89
c.	bHLHs	89
	<i>Structure</i>	89
	<i>Régulation post-traductionnelle</i>	90
C.	Modes d'actions	90
a.	SNAILS	90
b.	ZEBs	91
c.	bHLHs	91
d.	Bilan	91
D.	Les différentes cibles des FT clés de l'EMT	92
E.	Importance en cancérologie	93

F.	Modifications cellulaires et conséquences fonctionnelles secondaires à l'EMT	94
a.	Jonctions cellulaires	95
b.	Remodelage du cytosquelette	96
c.	Activité protéolytique	96
3.	LE PROCESSUS DE MET ET LA FORMATION DE MACRO-METASTASES	97

OBJECTIFS ET PRESENTATION DE CE TRAVAIL DE THESE	101
---	------------

RESULTATS ET DISCUSSIONS	105
---------------------------------	------------

I. ACTIVATION DE L'EMT DANS LES PCC/PGL <i>SDHB</i>-MALINS	105
---	------------

1.	TRAVAUX ANTERIEURS : L'EMT ET LA MALIGNITE DES PCC/PGL	105
2.	ARTICLE 1 : L'EMT DANS LES PCC/PGL <i>SDHB</i> -MALINS	106
A.	L'apport de la cohorte du réseau COMETE	106
B.	Résumé	107
C.	Article 1	108
3.	ANALYSES COMPLEMENTAIRES, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	109
A.	L'EMT dans une tumeur neuroendocrine	109
a.	La N-cadhérine	109
b.	La fibronectine et la vimentine	109
c.	La kératine 19	109
B.	Les tumeurs au classement discordant	111
a.	<i>SDHB</i> -bénins classés dans le cluster B.2	111
b.	<i>SDHB</i> -malins non classés dans le cluster B.2	112
C.	Localisation nucléaire de SNAIL et activation de l'EMT	113

II. RÔLE DE LA MÉTHYLATION DANS LA RÉGULATION DE L'EMT	115
---	------------

1.	CONTEXTE	115
A.	Métabolisme, épigénétique et cancer	115
B.	Les modèles d'étude des PCC/PGL	116
a.	Les souris génétiquement prédisposées	117
b.	Les modèles cellulaires	117
2.	ARTICLE 2 : L'HYPERMETHYLATION ASSOCIEE AUX MUTATIONS <i>SDHX</i>	117
A.	Résumé	117
B.	Article 2	119
3.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	121

III. RÔLES DE KRT19 DANS LE PHENOTYPE DES CELLULES <i>SDHB</i>^{-/-}	123
---	------------

1.	CONTEXTE	123
----	----------	-----

A. Résultats préliminaires	123
B. La kératine 19	124
2. ARTICLE 3 : IMPLICATION DE LA KRT19 DANS LE PHENOTYPE METASTATIQUE <i>SDHB</i> -DEPENDANT	124
A. Résumé	124
B. Article 3	125
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	127
 DISCUSSION & PERSPECTIVES	129
 I. LA TRANSITION NEUROENDOCRINO-MÉSENCHYMATEUSE (NEUROENDOMT)	129
II. LE PHÉNOTYPE « SUPER-HYPERMÉTHYLATEUR » DES TUMEURS <i>SDHB</i> -MUTÉES	129
III. <i>KRT19</i> , UN CANDIDAT IDÉAL	130
IV. LE RÔLE ESSENTIEL DE SNAIL DANS LES PCC/PGL <i>SDHB</i> -DÉPENDANTS	131
V. UN RÔLE POUR LA PROTÉINE <i>SDHB</i> AU-DELÀ DE LA SUCCINATE DÉSHYDROGÉNASE	133
 CONCLUSION GENERALE	135
 ANNEXES	139
 I. L'IMPORTANCE DES MUTATIONS SOMATIQUES DU GÈNE <i>NF1</i>	139
II. L'HYPERMÉTHYLATION DE <i>MGMT</i> DANS LES TUMEURS <i>SDHB</i> EST UN FACTEUR PRÉDICTIF DE BONNE RÉPONSE THÉRAPEUTIQUE AU TÉMOZOLOMIDE DANS LES PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES MÉTASTATIQUES	141
 BIBLIOGRAPHIE	143

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-HG : 2-hydroxyglutarate

α -KG : α -kétooglutarate

aa : acide aminé

Ach : acétylcholine

ADN : acide désoxyribonucléique

Ad : adrénaline (= épinéphrine)

ARN : acide ribonucléique

bHLH : basic helix-loop-helix (= structure basique hélice-boucle-hélice)

CMT : carcinome médullaire de la thyroïde

CPH : collagen prolyl-hydroxylase (prolyl-hydroxylase du collagène)

CPT : carcinome papillaire de la thyroïde

DA : dopamine

DNMT : DNA methyltransferase (= méthyltransférase de l'ADN)

EMT : epithelial to mesenchymal transition (= transition épithélio-mésenchymateuse)

EndoMT : endothelial to mesenchymal transition (= transition endothélio-mésenchymateuse)

FAD : flavine adénine dinucléotide

FH : fumarate hydratase (= fumarase)

FIRSTMAPPP : first international randomised study of malignant and progressive pheochromocytomas and paragangliomas (= première étude randomisée internationale sur les phéochromocytomes et les paragangliomes avancés ou métastatiques en progression)

FMTC : familial medullar thyroid carcinoma (= carcinome médullaire de la thyroïde familial)

FT : facteur de transcription

GAPP : grading for adrenal pheochromocytoma and paraganglioma (= classification pour les phéochromocytomes et les paragangliomes)

GBM : glioblastome multiforme

GIST : gastro-intestinal stromal tumor (= tumeur sarcomateuse gastro-intestinale)

GSK-3 : glycogen synthetase kinase 3 (= kinase 3 de la glycogène-synthétase)

GST : gène suppresseur de tumeur

HDAC : histone deacetylase (= désacétylase des histones)

HIF : hypoxia-induced factor (= facteur induit par l'hypoxie)

HLRCC : hereditary leiomyomatosis renal cell cancer (= léiomyomatose et cancer du rein héréditaire)

HNP : head and neck paraganglioma (= paragangliome de la tête et du cou)

HRE : hypoxia response element (= élément de réponse à l'hypoxie)

HTA : hypertension artérielle

IDH : isocitrate déshydrogénase

IRM : imagerie à résonance magnétique

Kb : kilo base (1kb = 1000 pb)

kDa : kiloDalton

KDM : lysine déméthylase

LOH : loss of heterozygosity (= perte d'hétérozygotie)

LOX : lysyl-oxydase

MAPK : MAP Kinase (= mitogen activated protein)

MAX : MYC associated factor X

MCUL : multiple cutaneous uterin leiomyomata (= léiomyomatose multiple cutanée et utérine)
MIBG : metaiodobenzylguanidine
miR: micro ARN
MIS : mullerian inhibiting substance (= substance inhibitrice mullérienne)
MN : métanéphrine
MTY : méthoxytyramine
NAd : noradrénaline (=norépinephrine, NE)
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NEM2 : néoplasie endocrinienne multiple de type 2
NES : nuclear export signal (= signal d'export nucléaire)
NF1 : neurofibromatose de type 1
NGF : nerve growth factor (= facteur de croissance neuronal)
NLS : nuclear localization signal (= signal de localisation nucléaire)
NMN : normétanéphrine
OMS : organisation mondiale de la santé
ORL : oto-rhino-laryngé
PASS : pheochromocytoma of the adrenal scaled score (= échelle de score pour les phéochromocytomes surrénaliens)
Pb : paire de bases azotées
PCC : phéochromocytome
PET: positon emission tomography (= tomographie à émission de positon)
PGL : paragangliome
PHD : prolyl-hydroxylase
PI3K : phosphoinositide 3 kinase
OSE : ovarian surface epithelium (= épithélium de surface ovarien)
RCC : renal clear cell carinoma (= carcinome rénal à cellules claires)
RTK : récepteur tyrosine kinase
SDH : succinate déshydrogénase
SDHA : succinate déshydrogénase, sous-unité A
SDHB : succinate déshydrogénase, sous-unité B
SDHC : succinate déshydrogénase, sous-unité C
SDHD : succinate déshydrogénase, sous-unité D
SNA : système nerveux autonome
SNC : système nerveux central
SRD : serin-rich domain (= domaine riche en sérines)
SSR somatostatine receptor (= récepteur de la somatostatine)
TET : ten-eleven translocation (méthylcytosine hydroxylase)
TH : tyrosine hydroxylase
TK : tyrosine kinase
TMEM127 : transmembrane protein 127 (= protéine transmembranaire, membre 127)
VEGF : vascular endothelial growth factor
VHL : von Hippel-Lindau
VMA : vanil mandelic acid (= acide vanilmandélique)
WT : wild type (= sauvage, contrôle)
ZF : zinc finger (= doigt de zinc)

PRÉAMBULE

Plus d'un siècle après la première description d'un cas de tumeurs bilatérales des surrénales (le cas de Mina Roll rapporté par Felix Fränkel en 1884), les connaissances concernant les phéochromocytomes et les paragangliomes ont considérablement évolué.

Si les premières descriptions d'études de cas de phéochromocytomes/paragangliomes malins remontent aux années 1970, l'identification de la présence d'une mutation constitutionnelle du gène *SDHB* comme seul facteur de risque de malignité et de mauvais pronostic pour les patients atteints d'une forme métastatique est, elle beaucoup plus récente et date des années 2000.

Afin de pouvoir envisager des thérapies innovantes et efficaces pour le traitement de ces patients, il est nécessaire de comprendre plus en détails les mécanismes reliant les mutations du gène *SDHB* à l'agressivité tumorale.

Dans ce travail de thèse, je me suis intéressée à la transition épithélio-mésenchymateuse, comme une voie de signalisation pouvant être impliquée dans la dissémination métastatique des phéochromocytomes/paragangliomes *SDHB*-dépendants.

Ce manuscrit regroupe l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, et s'articule en trois parties. L'introduction générale retrace les connaissances actuelles concernant les phéochromocytomes et les paragangliomes ainsi que les mécanismes de la transition épithélio-mésenchymateuse. Elle est suivie d'une partie consacrée aux résultats, décrivant l'expression des gènes de la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse dans une cohorte d'échantillons tumoraux humains (phéochromocytomes et paragangliomes collectés par le réseau COMETE) ainsi que les données fonctionnelles obtenues dans un modèle cellulaire murin d'inactivation du gène *Sdhb*. Enfin une troisième partie sera consacrée à la discussion ainsi qu'aux perspectives de ce travail.

Les résultats obtenus sont illustrés sous la forme d'articles publiés au cours de ce travail de thèse, ainsi que sous la forme d'analyses complémentaires.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES

1. Définitions

Les phéochromocytomes (PCC) et les paragangliomes (PGL) sont des tumeurs neuroendocrines rares, dont la prévalence est estimée à 1 pour 20 000, et qui sont de fait classées parmi les maladies orphelines (OMIM #171300). Selon la définition officielle de l'organisation mondiale de la santé (OMS), les phéochromocytomes sont des tumeurs qui se développent exclusivement aux dépens de la médullosurrénale, alors que le terme de paragangliome regroupe toutes les autres tumeurs issues du tissu nerveux sympathique ou parasympathique. Ces tumeurs sont dites fonctionnelles, lorsqu'elles secrètent des catécholamines (dopamine, adrénaline ou noradrénaline).

Ces tumeurs sont rarement malignes, volontiers multiples ou bilatérales, et peuvent s'intégrer dans le tableau clinique de diverses pathologies syndromiques.

2. Origine embryonnaire

A. Les cellules de la crête neurale

Au 28^{ème} jour de l'embryogenèse chez l'Homme, le tube neural se délimite après avoir libéré des amas cellulaires qui constituent les crêtes neurales. Ces cellules pluripotentes aux capacités migratoires importantes prolifèrent et migrent en profondeur pour donner de nombreux types cellulaires différents (Figure 1). Elles donneront notamment naissance aux neurones et aux cellules gliales du système nerveux périphérique (sympathique, parasympathique et sensoriel), aux mélanocytes qui pigmenteront la peau, ou encore aux os et cartilages du crâne et du cou [1, 2].

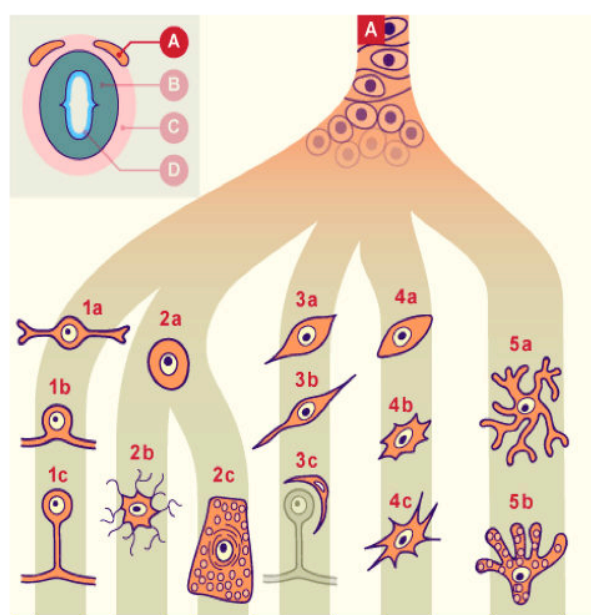


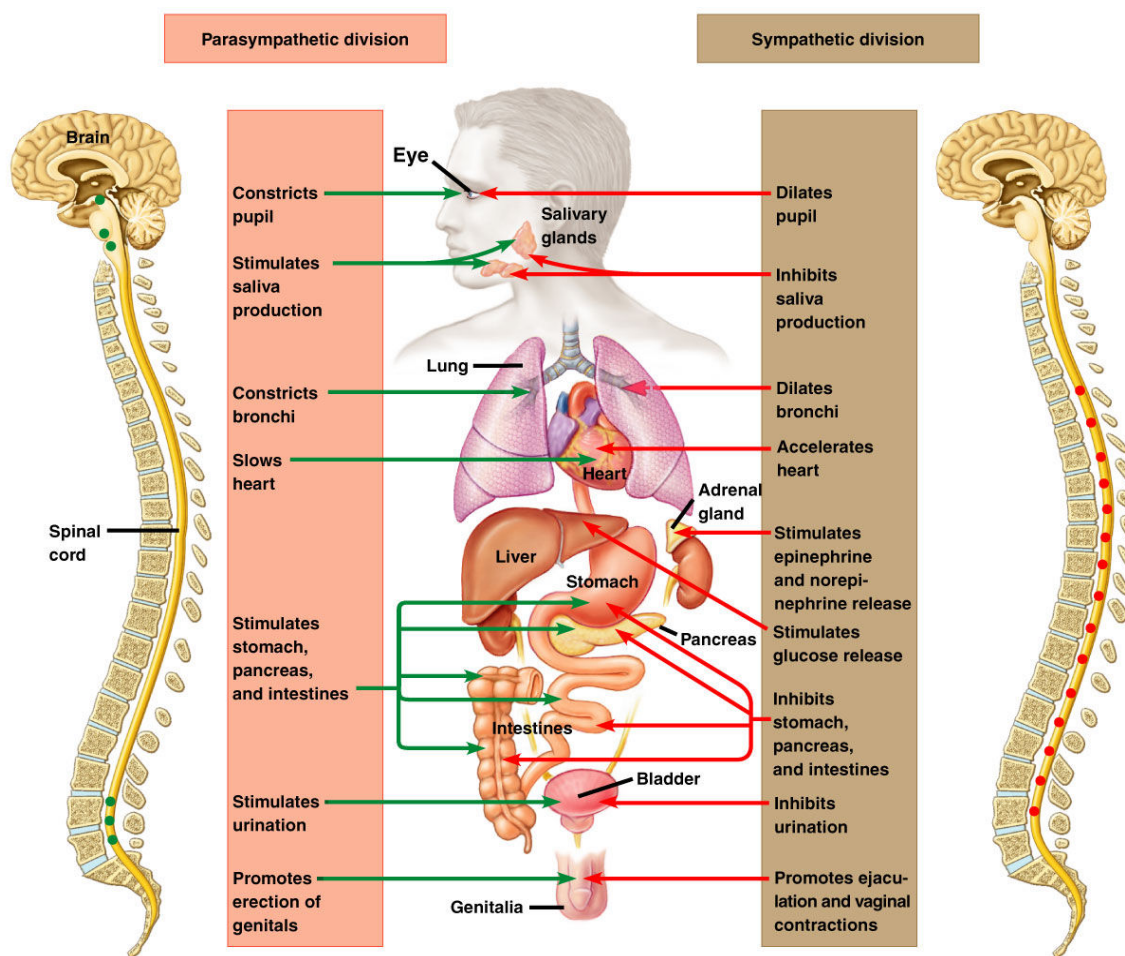
Figure 1 : Les cellules dérivées des crêtes neurales

Les cellules des crêtes neurales sont multipotentes, et sont capables de donner naissance à plusieurs lignées cellulaires : **1a** neuroblaste bipolaire, **1b** neuroblaste bipolaire en différenciation, **1c** neurone sensitif pseudo-unipolaire des ganglions rachidiens, **2a** neuroblaste unipolaire, **2b** neurone multipolaire des ganglions sympathiques, **2c** médulloblaste (cellules chromaffines), **3a** glioblaste, **3b** cellule de Schwann, **3c** cellule satellite, **4a** cellule mésenchymateuse, **4b** cellule des leptoméniges (arachnoïde et pie-mère), **4c** cellule de l'ectomésenchyme, **5a** mélanoblaste (cellule pigmentaire), **5b** mélanocyte, **A** crête neurale, **B** tube neural (zone du manteau), **C** mésenchyme, **D** tube neural (couche épendymaire).

D'après : <http://www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete04.html>

B. Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome (SNA, aussi appelé végétatif, viscéral, organo-végétatif ou involontaire), à la différence du système nerveux central (SNC), contrôle des actions non soumises à la volonté ; il régule en effet les fonctions cardiaques, respiratoires, digestives, endocrines et exocrines. Il se divise en deux sous-systèmes : le système sympathique (ou orthosympathique) et le système parasympathique, qui innervent les mêmes organes cibles. Étant soumis aux régulations de deux sous-systèmes aux actions opposées, ces organes sont, à l'état physiologique, maintenus dans un état d'équilibre homéostatique. Les somi des neurones présynaptiques du système parasympathique sont localisés dans le tronc cérébral et dans la moelle sacrée, tandis qu'on les retrouve dans la moelle thoracique et lombaire pour le système sympathique (Figure 2).



Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

Figure 2 : Systèmes sympathique et parasympathique

Les neurones présynaptiques sont signalés en vert (parasympathique) et en rouge (sympathique), ainsi que leurs actions sur les différents organes cibles du SNA.

Les corps cellulaires des neurones post-synaptiques sont regroupés en ganglions, situés à proximité des organes cibles. Dans le système parasympathique, ce sont les ganglions intramuraux ; dans le système sympathique ce sont les ganglions rachidiens, constitutifs de la chaîne ganglionnaire paravertébrale sympathique, en périphérie de la colonne vertébrale.

Les neurones présynaptiques du SNA sont cholinergiques, et libèrent de l'acétylcholine (Ach), qui agit sur les récepteurs nicotiniques des neurones post-synaptiques. Les deux sous-systèmes sont caractérisés par leurs neurotransmetteurs, le système sympathique agit principalement *via* la noradrénaline (NAd), tandis que le système parasympathique agit sur ses organes cibles *via* l'Ach (Figure 3).

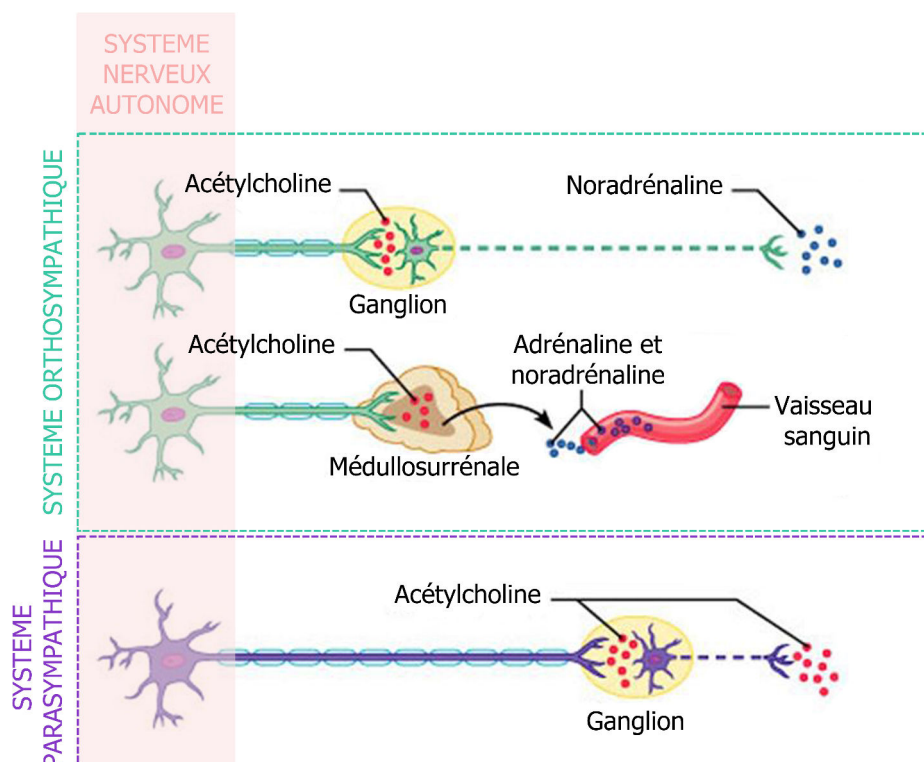


Figure 3 : Représentation schématique du système nerveux autonome.

Le SNA est composé de deux sous-systèmes : orthosympathique (ou sympathique) et parasympathique. Les neurones présynaptiques sont cholinergiques et libèrent de l'Ach. Les neurones post-synaptiques sont adrénergiques (libération d'adrénaline et de NAd) dans le système sympathique, et cholinergiques dans le système parasympathique.

a. Le système nerveux sympathique

Le système sympathique permet de répondre en cas de stress (« la fuite ou la lutte ») *via* l'activité de ses neurotransmetteurs. L'adrénaline (Ad) et surtout la NAd augmentent les activités cardiaques et respiratoires, la sécrétion de sueur et la pression artérielle, et réduisent la fonction digestive.

Exception faite des glandes sudoripares, innervées par le sous-système sympathique, mais dont l'action est médiée par l'Ach qui agit alors sur des récepteurs muscariniques (*cf.* ci-après), le médiateur chimique du système sympathique est la NAd, qui est capable de se lier aux récepteurs adrénergiques (α_1 , α_2 , β_1 et β_2).

La L-tyrosine, dont la source est l'alimentation, rejoint la circulation sanguine, passe la barrière hémato-encéphalique et est captée par les neurones catécholaminergiques. Elle est alors hydrolysée en L-DOPA (étape limitante de la voie de biosynthèse). La première catécholamine synthétisée est la dopamine (DA), qui résulte de la décarboxylation de la L-DOPA. La NAd provient de l'hydroxylation de la DA, tandis que l'Ad est le produit de la méthylation de la NAd (par la Phényléthanolamine-N-méthyl-transférase, PNMT).

DA, NAd et Ad sont donc les trois neuro-hormones qui constituent le groupe des catécholamines, caractéristiques du système sympathique (Figure 4). Elles sont synthétisées par les cellules chromaffines de la médullosurrénale et par les neurones post-ganglionnaires du système nerveux orthosympathique.

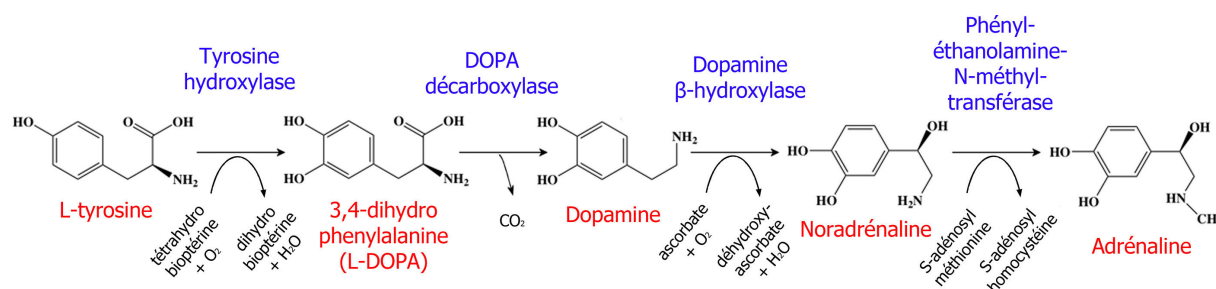


Figure 4 : Voie de biosynthèse des catécholamines

b. Le système nerveux parasympathique

Le système parasympathique est associé au ralentissement et à l'économie d'énergie. Tout ce qui est stimulé par le système sympathique (activités respiratoire, cardiaque et pression artérielle notamment) est freiné par le système parasympathique. En revanche, il agit comme stimulateur des fonctions digestives et sexuelles.

Le médiateur chimique associé à ce sous système est l'Ach, dont les effets sont opposés à ceux de l'Ad et de la NAd. Son action est médiée par les récepteurs muscariniques, récepteurs à 7 domaines transmembranaires dont il existe 5 types (M1 à M5).

L'acétyl-coenzyme-A mitochondrial (résultant de la transformation du glucose en pyruvate lors de la glycolyse) est transféré, dans les terminaisons axonales, sur la choline pour former l'Ach (Figure 5). L'Ach, exerce aussi ses actions au niveau du système nerveux central (apprentissage, mémoire), et au niveau du système nerveux périphérique (activité musculaire, action au niveau des synapses entre motoneurones et muscles squelettiques).

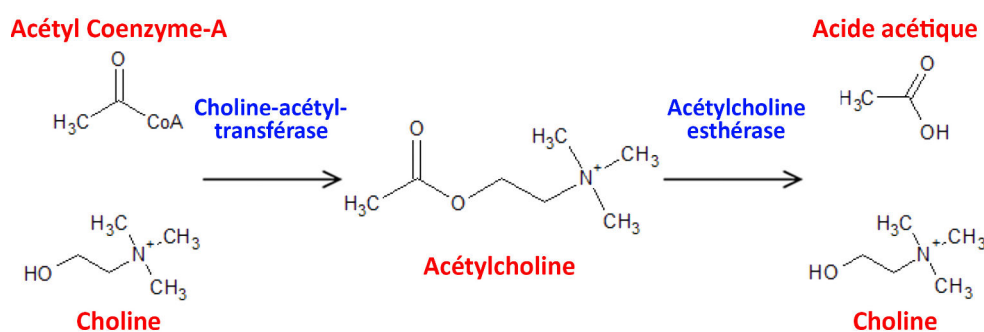


Figure 5 : Voie de biosynthèse et de dégradation de l'acétylcholine

Après libération dans la fente synaptique, l'Ach est prise en charge par l'acétylcholine-estérase, qui assure son clivage en acide acétique et choline, cette dernière étant pour moitié directement recaptée par la terminaison présynaptique.

c. *Cas particulier de la médullosurrénale*

La médullosurrénale fait partie intégrante du système sympathique, et est considérée comme un ganglion modifié, un ganglion autonome. Les cellules chromaffines, constituant la médullosurrénale, correspondent à des neurones post-synaptiques, ce sont des neurones modifiés (des cellules neuroendocrines). Elles n'agissent pas sur des organes cibles *via* des synapses comme les autres neurones post-synaptiques du système nerveux végétatif, mais sécrètent et libèrent les catécholamines (DA, NAd, Ad) dans la circulation sanguine. Ces neuro-hormones vont alors agir à distance, sur leurs organes cibles.

De par ses afférences nerveuses, la médullosurrénale participe à la régulation de la pression artérielle. En effet *via* les barorécepteurs du sinus carotidien, de la crosse aortique et de l'oreillette droite, elle répond aux variations de pressions en oxygène et en dioxyde de carbone et module la pression artérielle par le biais de la sécrétion de catécholamines.

3. Caractéristiques cliniques / symptomatologie

Du fait de leur localisation au niveau de la médullosurrénale ou des paraganglions sympathiques, les PCC et les PGL du système sympathique sont des tumeurs dites fonctionnelles, capables le plus souvent de stocker, de sécréter et de métaboliser des catécholamines (DA, NAd, Ad). Les principaux symptômes décrits chez les patients atteints de PCC/PGL sont donc essentiellement la conséquence de ces sécrétions sur leurs organes cibles (*cf.* Figure 2). Les PGL parasympathiques sont eux le plus souvent non sécrétants et révélés par un syndrome de masse.

A. Cas des tumeurs sécrétantes

Parmi les symptômes les plus répandus, on retrouve classiquement l'hypertension artérielle (HTA, typiquement paroxystique ou permanente), les céphalées, les palpitations, les sueurs, mais aussi des malaises avec dyspnées, nausées et pâleur. De façon plus rare, des arythmies et des décompensations cardiaques inaugurales, des douleurs abdominales, un amaigrissement, des troubles de la vision, voire des manifestations psychiatriques de type psychoses ou attaques de panique ont également été décrits [3].

B. Cas des tumeurs non fonctionnelles

Le diagnostic des tumeurs non-sécrétantes, développées aux dépens du système nerveux sympathique, est beaucoup plus complexe à poser. Huit à 9% des cas sporadiques, et 21 à 31 % des cas héréditaires de paragangliomes seraient en effet caractérisés par une absence d'hypersécrétion de catécholamines [4]. Parmi les cas rapportés, les symptômes évoqués sont généralement des douleurs, accompagnées ou non d'autres signes comme la fatigue ou encore la thrombose veineuse. L'étude de Timmers, publiée en 2008, suggère pour ces tumeurs dites « silencieuses », que l'absence d'hypersécrétion de catécholamines soit le reflet d'une perte d'expression de la tyrosine hydroxylase (TH), la première enzyme de la voie de biosynthèse des catécholamines [4]. Chez ces patients, le

diagnostic de la maladie est retardé et se fait de façon fortuite, à la suite de l'évolution du syndrome tumoral, ou bien à cause d'une lésion secondairement symptomatique. Ainsi, dans les formes oto-rhino-laryngées (ORL), la maladie est classiquement révélée par la découverte d'une masse cervicale éventuellement pulsatile, d'une hypoacousie ou d'une surdité, d'acouphènes voire d'une atteinte des nerfs crâniens [5].

Les PCC/PGL peuvent également être découverts de façon incidente, lors d'une imagerie réalisée pour l'exploration d'une autre pathologie, ou lors d'un bilan prescrit chez un sujet asymptomatique porteur d'une mutation sur un gène de prédisposition au PCC/PGL identifié par le dépistage génétique familial (voir paragraphes 6. Génétique des PCC/PGL et 7. Test génétique).

4. Diagnostiquer les PCC et les PGL

A. Diagnostic biochimique

La première étape du diagnostic de ces tumeurs repose sur la mise en évidence d'une sécrétion anormalement élevée de catécholamines.

a. Métabolisme des catécholamines

La majorité des catécholamines libérées par les synapses neuronales sont re-capturées dans la fente synaptique, directement par le neurone présynaptique. Seule une petite fraction va rejoindre la circulation sanguine, où elle sera modifiée avant d'être éliminée par les reins dans les urines. Deux enzymes : la MAO (monoamine oxydase) et la COMT (catéchol-O-méthyl transférase) participent à l'inactivation des catécholamines :

- la DA se retrouve sous forme d'acide homovanillique, avec deux intermédiaires possibles, la méthoxytyramine (MTY) et la dopacétaldéhyde.
- la norépinéphrine et l'épinéphrine sont respectivement modifiées en normétanéphrine (NMN) et en métanéphrine (MN), après méthylation.

L'oxydation de ces métanéphrines donne ensuite lieu à l'acide vanilmandélique (VMA, Figure 6).

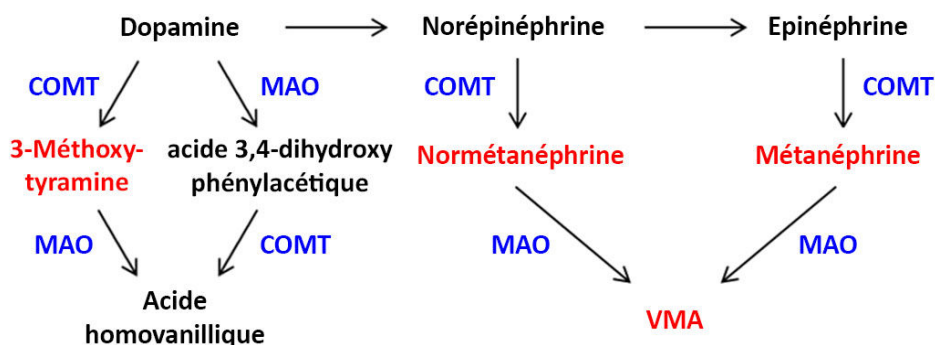


Figure 6 : Voie de dégradation des catécholamines

MAO : Monoamine oxydase, COMT : catéchol-O-méthyl transférase, VMA : acide vanilmandélique

Les métanéphrines peuvent être retrouvées libres, ou sous forme conjuguées, avec des dérivés O-méthyl, des groupements sulfate, ou sous forme de glucuronides (conjugaison avec l'acide glucuronique) [6, 7].

b. Les différents profils sécrétoires

L'hétérogénéité des PCC/PGL se reflète également à travers le profil sécrétoire des tumeurs : la quantité et le type de catécholamine produite peuvent varier, ainsi que la sécrétion qui peut être continue ou épisodique. Il a été mis en évidence qu'en fonction de leur génotype (*cf.* Paragraphe I. 6. Génétique du phéochromocytome/paragangliome), les PCC/PGL pouvaient être regroupés en tumeurs dopaminergiques, noradrénergiques ou adrénérgiques. Ces différences sont à la fois dues à des différences d'expression des enzymes responsables de la synthèse des catécholamines, et à des modes de sécrétion des catécholamines différents (sécrétion constitutive ou régulée) [8, 9].

Schématiquement, les patients atteints de néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM2, causée par des mutations du gène *RET*) ou de neurofibromatose de type 1 (NF1) (voir paragraphe 6. Génétique des PCC/PGL) développent des tumeurs très différenciées. Les cellules tumorales expriment donc toutes les enzymes et protéines nécessaires à la synthèse, au stockage, au métabolisme et la sécrétion des catécholamines. Elles sont de ce fait caractérisées par une production de NAd et d'Ad, et par une excrétion de leurs dérivés O-méthylés (NMN et MN). Les tumeurs mutées sur les gènes *SDHx* ou *VHL* sont quant à elles peu différenciées, elles produisent et sécrètent massivement de la NAd et de la NMN. Ces tumeurs sont par ailleurs caractérisées par une absence de synthèse d'Ad et de sécrétion de MN, ceci étant expliqué par un défaut d'expression de la PNMT. Les tumeurs *SDHx*-mutées (et notamment *SDHB*-mutées) peuvent cependant être différenciées des tumeurs *VHL* par leur capacité de production de DA et de MTY. Cette différence serait le résultat d'un défaut d'expression de la dopamine- β -hydroxylase [10-12].

La sécrétion des tumeurs *RET/NF1* est régulée, on retrouve donc classiquement des concentrations élevées de catécholamines tumorales (présence de larges vésicules de stockage dans les cellules), mais des concentrations plasmatiques et urinaires moins importantes. En revanche les tumeurs *SDHx* et *VHL* présentent un profil sécrétoire dit « constitutif » (non régulé). Ces tumeurs sont donc classiquement associées à des concentrations tumorales plus faibles de catécholamines, mais à des taux de sécrétion et d'excrétion élevés [8] (Table1).

Profil génétique	Catécholamines tumorales	Métanéphrines plasmatiques	Métanéphrines urinaires
RET	NAd, Ad	NMN, MN	NMN, MN
NF1	NAd, Ad	NMN, MN	NMN, MN
VHL	NAd	NMN	NMN
SDH	NAd, DA	NMN, MTY	NMN, MTY

Table 1 : Stockage et sécrétion des catécholamines selon le profil génétique

DA : dopamine, NAd : noradrénaline, Ad : adrénaline, NMN : normétanéphrine, MN : métanéphrine, MTY : méthoxytyramine

c. Dosages biochimiques

Les catécholamines, les métanéphrines ou encore le VMA sont des composés qu'il est possible de doser, ce qui peut constituer un test diagnostique pour la mise en évidence d'une tumeur fonctionnelle. Les dosages peuvent être plasmatiques ou urinaires, focalisés sur les métanéphrines libres, fractionnées ou totales.

Cependant dans les cellules chromaffines, la COMT est majoritairement présente sous sa forme membranaire, très affine pour les catécholamines. De ce fait, dans les cellules chromaffines et dans les tumeurs, les catécholamines subissent préférentiellement un métabolisme d'O-méthylation, conduisant à la formation de métabolites O-méthylés (MN et NMN). Dans le tractus gastro-intestinal,

et dans le foie notamment, la COMT est majoritairement soluble, les catécholamines sont donc plutôt prises en charge par la MAO, avant d'être éliminées dans les urines par les reins. Les métanéphrines, qui sont plus augmentées que les catécholamines, sont par ailleurs le reflet direct de la sécrétion tumorale [13].

Différentes études réalisées sur des cohortes indépendantes ont d'ailleurs montré que le dosage des métanéphrines libres plasmatiques représentait le test le plus sensible (au-delà de 96%, toutes études confondues) permettant de mettre en évidence la présence d'une tumeur, ou de l'exclure avec une excellente valeur prédictive (proche de 100%) [14, 15]. Les recommandations sont donc le dosage de métanéphrines libres plasmatiques en première intention, qui peut être complété par un dosage urinaire, en seconde intention. Ces dosages sont effectués en utilisant la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection électrochimique ou couplée à la spectrométrie de masse en tandem [15].

Néanmoins, l'alimentation, la médication et le stress étant des sources de catécholamines (conjuguées), il est nécessaire de retirer de son alimentation quelques éléments comme le café, le thé, la vanille, la nicotine, ou encore le chocolat et la banane avant tout prélèvement pour un dosage. De même il est important de tenir compte du traitement médicamenteux des patients qui peut interférer avec les dosages [6, 7].

B. Imagerie

Lorsque les dosages (urinaires ou plasmatiques) ou la présentation clinique permettent de suspecter une tumeur, *via* son excès de sécrétion ou un syndrome tumoral, l'enjeu majeur est de pouvoir localiser cette tumeur afin d'envisager une exérèse chirurgicale.

Pour cela, il est possible de recourir à de l'imagerie conventionnelle, qui permet d'obtenir uniquement des informations anatomiques et à de l'imagerie fonctionnelle, qui renseigne donc sur les caractéristiques fonctionnelles de la tumeur. L'imagerie fonctionnelle est préférable à la biopsie, à cause des risques majeurs associés à la manipulation tumorale (crise hypertensive notamment).

L'imagerie conventionnelle (scanner et IRM, imagerie à résonance magnétique) permet d'obtenir des clichés de très haute résolution, mais de spécificité moindre. L'imagerie fonctionnelle est quant à elle hautement spécifique, mais de sensibilité variable, selon les techniques, les localisations tumorales et le statut génétique des patients (voir Paragraphe 6. Génétique du PCC/PGL). L'imagerie fonctionnelle repose sur l'utilisation d'agents radio-marqués très spécifiques qui permettent la mise en évidence des cellules chromaffines tumorales [16, 17]. Deux types d'imagerie fonctionnelle sont disponibles, la scintigraphie et la tomographie à émission de positon (PET). Ces deux techniques permettent la mise en évidence des mêmes structures, puisque les cibles de leurs traceurs sont équivalentes (*cf.* Table 2). La nature des agents radio-marqués, et leurs propriétés de désintégration sont cependant différentes. Ainsi, la détection des agents utilisés en PET permet d'obtenir des images de résolution plus élevée.

La scintigraphie à l'¹²³I-MIBG (méta-iodo-benzyl-guanidine), est une technique hautement spécifique, elle utilise un analogue de la guanidine, de structure équivalente à la norépinephrine (NE). Ce traceur est internalisé dans les cellules *via* le transporteur de la NE et stocké dans les vésicules de sécrétion

où il est détecté en imagerie (Figure 7.1). Cette technique est particulièrement recommandée pour la détection des PCC sporadiques.

L'équivalent en PET de l' ^{123}I -MIBG est la ^{18}F -Fluorodopamine (^{18}F -FDA, uniquement disponible aux Etats-Unis), qui utilise les mêmes transporteurs (Figure 7.1). Deux autres traceurs sont néanmoins disponibles en France, avec des modes d'internalisation différents. Le 6 [^{18}F]-fluoro-L-DOPA (^{18}F -FDOPA) subit une étape de décarboxylation, par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC), le ^{18}F -FDA résultant est alors stocké dans les vésicules de sécrétion des cellules chromaffines où il sera détecté (Figure 7.2). Le ^{18}F -FDOPA est recommandé pour la détection des paragangliomes de la tête et du cou (head and neck paraganglioma, HNP) et des tumeurs métastatiques (non porteuses de mutation sur le gène *SDHB*). L'autre traceur disponible est le ^{18}F -Fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG). Ce traceur est beaucoup moins spécifique, puisqu'il utilise un analogue du glucose, internalisé par les cellules *via* les transporteurs du glucose (GLUT). Il subit une phosphorylation par l'hexokinase, puis est stocké et accumulé dans les cellules (Figure 7.3). Le ^{18}F -FDG est recommandé pour les PGL abdominaux *SDHx*- et *VHL*-dépendants, et est particulièrement efficace pour la détection des tumeurs *SDHB* métastatiques.

L'Octreoscan® (à l' ^{111}In DTPA D-Phe-Pentetreotide), est une scintigraphie utilisant un analogue de la somatostatine, utilisée pour le bilan des lésions dans les HNP, les PGL sus-diaphragmatiques et les tumeurs malignes [17-21]. La somatostatine est une hormone pituitaire, au rôle d'inhibiteur de l'hormone de croissance au niveau du système nerveux central et périphérique. On la retrouve au niveau de la glande surrénale, où elle est capable d'inhiber la croissance normale et tumorale des cellules, en se fixant à des récepteurs membranaires spécifiques : les récepteurs de somatostatine (SSR). Il en existe 5 types décrits, exprimés à forte densité à la surface des cellules tumorales neuroendocriniennes (notamment le type 2, Figure 7.4).

L'équivalent en PET de l'Octreoscan® utilise des agonistes des SSR couplés à la DOTA marqués au ^{68}Ga ; il peut s'agir de ^{68}Ga -DOTATOC, de ^{68}Ga -DOTANOC ou encore de ^{68}Ga -DOTATATE. L'internalisation du complexe ligand-récepteur permet ensuite la détection en imagerie (Figure 7.4). Ces traceurs sont notamment recommandés pour la détection des HNP et des tumeurs métastatiques.

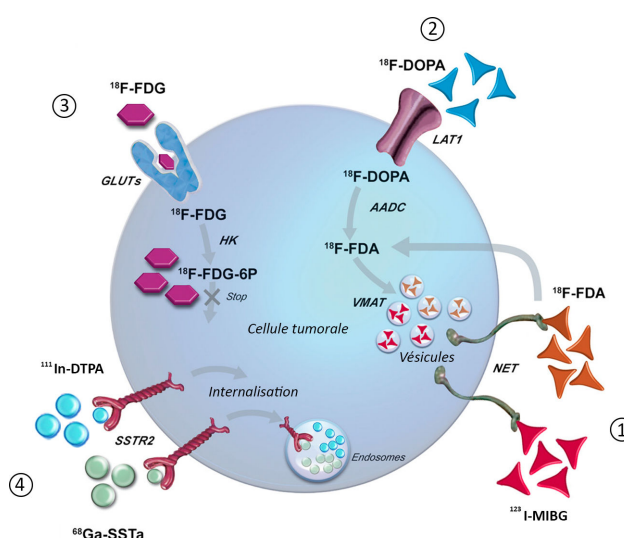


Figure 7 : Représentation des voies d'internalisation des traceurs utilisés en scintigraphie et en PET pour la détection des PCC/PGL. Adapté de Taïeb et al., 2012 [22].

SCINTIGRAPHIE	PET
¹²³ I-MIBG : analogue NE Recommandations : PCC sporadiques - sensibilité : 95-100 %	¹⁸ F-FDA : analogue NE Recommandations : PGL sympathiques ¹⁸ F-FDOPA : analogue L-DOPA Recommandations : HNPGL, PCC/PGL métastatiques (non <i>SDHB</i>) - sensibilités : 97-100%, 93% ¹⁸ F-FDG : analogue glucose Recommandations : métastatiques, <i>SDHB</i> -malins - sensibilités : 83%, 62%
¹¹¹ In-Pentetreotide (Octréoscan ®) Recommandations : HN + thorax PGLs - sensibilité : 89-100%	⁶⁸ Ga-DOTATOC / ⁶⁸ Ga-DOTANOC / ⁶⁸ Ga-DOTATATE : Recommandations : HNPGL, PGLs métastatiques - sensibilité : en cours d'évaluation

Table 2 : Les différents traceurs utilisés en imagerie fonctionnelle des PCC/PGL

La place des nouveaux traceurs TEP semble extrêmement prometteuse pour le diagnostic des PPC/PGL, il reste cependant à évaluer leurs sensibilités et spécificités sur de grandes séries prospectives multicentriques [23].

De façon générale, un scanner thoraco-abdomino-pelvien (pour rechercher les PGL thoraco-abdomino-pelviens et les PCC) et une angio-IRM de la tête et du cou (pour les PGL cervicaux) sont recommandés en première intention. L'IRM, examen non-irradiant, est préférable chez les enfants et les femmes enceintes [21]. Pour une plus grande spécificité, il est intéressant de coupler ces clichés de hautes résolutions à de la scintigraphie ou de la TEP (selon les cas) (Figure 8).

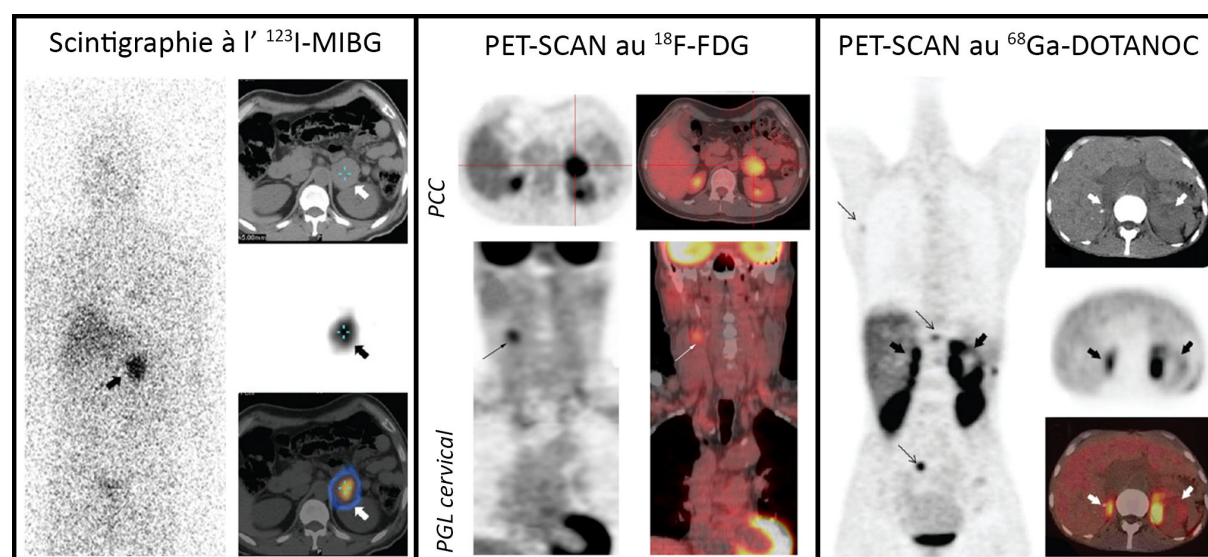


Figure 8 : Techniques d'imagerie pour la mise en évidence de PCC/PGL

L'imagerie conventionnelle fournit des clichés de haute qualité qui, fusionnés avec l'imagerie fonctionnelle (bien que moins résolutive), permet la localisation spécifique des tumeurs du tissu chromaffine ou de ces métastases. Exemples d'images obtenues en scintigraphie ¹²³I-MIBG ou en PET-scan ¹⁸F-FDG et ⁶⁸Ga-DOTANOC. Adapté de Taïeb, 2009 et de Sharma, 2012 [24, 25].

C. Diagnostic histologique

Le diagnostic histologique de PCC ou de PGL repose sur l'étude de la pièce chirurgicale après son exérèse. Classiquement une coloration hématoxyline/éosine est réalisée sur une coupe de tissu fixé. L'architecture des PCC/PGL décrit classiquement des cellules tumorales au cytoplasme granuleux,

avec un pléiomorphisme nucléaire. Ces cellules sont regroupées en nids ou « Zellballen » délimités par des cellules de soutien non néoplasiques : les cellules sus-tentaculaires.

L'étude de marqueurs neuroendocrines tels que la chromogranine A, CD56, la synaptophysine ou encore l'énolase neurone-spécifique (neuron specific enolase, NSE) peut être utilisée pour identifier les cellules neuroendocrines. Un marquage positif de la TH permet par ailleurs une distinction entre les PCC/PGL et les autres tumeurs neuroendocrines susceptibles d'être positives pour la chromogranine A (tumeurs neuroendocrines pulmonaires ou gastro-intestinales) [26]. Enfin un immunomarquage S-100, qui révèle les cellules sus-tentaculaires (ou cellules de soutien), caractéristiques des PCC/PGL peut être réalisé.

5. Malignité

A. Définition

Les PCC et les PGL peuvent être des tumeurs bénignes (parfaitement localisées), ou des tumeurs métastatiques (lorsque des cellules tumorales sont identifiées à distance de la tumeur primaire et/ou dans les ganglions lymphatiques régionaux). Depuis 2004, selon les recommandations de l'OMS un PCC/PGL est considéré comme étant malin lorsque des cellules chromaffines sont identifiées en dehors d'organes ou de tissus paraganglionnaires.

Il n'existe pas de manifestations cliniques propres aux tumeurs malignes, les symptômes sont donc les mêmes que ceux décrits pour les tumeurs bénignes fonctionnelles, et liés à l'excès de sécrétion hormonale (HTA paroxystique, céphalées, sueurs, palpitations, etc.) ou à la compression d'organes de voisinage. Seule la persistance de symptômes d'hypersécrétion après exérèse chirurgicale de la tumeur est évocatrice de la présence sous-jacente de métastases ou d'une récurrence [27]. Les marqueurs biologiques et histologiques utilisés pour le diagnostic d'une tumeur métastatique sont donc les mêmes que ceux utilisés pour la mise en évidence d'un PCC ou d'un PGL.

B. Critères de malignité

De nombreuses études, portant sur des critères anatomo-pathologiques, immunohistologiques ou encore biologiques ont été menées pour tenter d'identifier et de prédire le potentiel métastatique d'une tumeur primaire, avant le développement de métastases.

a. Critères anatomo-pathologiques

Parmi les critères anatomo-morphologiques, la taille, le poids ainsi que la localisation tumorale ont été corrélés avec le potentiel métastatique des PCC/PGL. Bien que les tumeurs malignes soient rapportées comme généralement de taille plus importante, comme ayant une masse supérieure et une localisation préférentiellement extra-surrénalienne, ces critères ne permettent pas de prédire la malignité (*cf.* Table 3). Ils peuvent constituer des indicateurs mais ne sont pas suffisants (même associés) pour poser un diagnostic.

	Étude	Malins	Bénins	Références
Dimension	Shen et al.	7,6 ± 4,2 cm	5,3 ± 2,3 cm	[28]
	Strong et al.	8 cm	5,1 cm	[29]
	Agarwal et al.	7,2 ± 2,6 cm	-	[30]
	Ayala-Ramirez et al.	8,2 cm	4,9 cm	[31]
	De Wailly et al.	9,7 cm ± 4 cm	5 ± 2,1 cm	[32]
Poids	Linnoila et al.	383 g	73 g	[33]
	John et al.	145 g	24 g	[34]
	Strong et al.	958 g	90 g	[29]
	Agarwal et al.	139 ± 136 g	-	[30]
	De Wailly et al.	292 ± 236,7 g	60,5 ± 43,8 g	[32]
Localisation extra-surrénalienne	Linnoila et al.	52 %	-	[33]
	John et al.	50 %	15 %	[34]

Table 3 : Comparaison de la taille, du poids et de la localisation des PCC bénins et malins

En 2002, Thompson introduit le score de PASS (Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score), afin de tenter de mettre au point une échelle chiffrée permettant de prédire le potentiel métastatique des PCC. Il prend en compte 12 critères cliniques et biologiques, auxquels sont attribués des scores différents (Table 4) dont la somme permet d'établir le score de PASS d'une tumeur (de 0 à 20).

N°	Description	Score
1	Large îlots ou croissance diffuse (>10% du volume tumoral)	2
2	Nécrose localisée au centre d'îlots ou confluent	2
3	Cellularité élevée	2
4	Monotonie cellulaire	2
5	Aspect fusiforme (même uniquement focal)	2
6	Index mitotique >3/10 HPF	2
7	Mitoses atypiques	2
8	Infiltration du tissu adipeux adjacent	2
9	Invasion vasculaire	1
10	Invasion capsulaire	1
11	Polymorphisme nucléaire profond	1
12	Hyperchromatisme nucléaire	1

Table 4 : Critères utilisés pour l'établissement d'un score de PASS

Thompson et ses collaborateurs définissent un seuil à 4, au-delà duquel une tumeur est considérée comme ayant un potentiel agressif et métastatique. En dessous de ce score les tumeurs sont considérées comme bénignes [35].

Bien que l'utilisation de ce score ait permis à quelques études de différencier les tumeurs bénignes des malignes de leurs collections [29, 32, 36], d'autres ont en revanche conclu à sa non-applicabilité pour établir de façon certaine un diagnostic de malignité [30]. Une étude multicentrique réalisée, par cinq anatomopathologistes spécialistes des tumeurs endocrines, a d'ailleurs invalidé l'utilisation de ce score en tant qu'outil de pronostic clinique. En effet, ils ont mis en évidence des différences inter-observateurs importantes, aboutissant à un diagnostic de malignité différent (score <4 ou ≥4) pour un même échantillon, en suivant scrupuleusement les modalités d'établissement du score. Par ailleurs des différences intra-observateurs achèvent de suggérer la difficulté d'application d'un tel score, à la fois observateur-dépendant lors de son établissement, et difficilement reproductible par un même spécialiste [37].

Très récemment, Kimura et al. ont proposé une nouvelle méthode de classification permettant de stratifier les PCC et les PGL selon leur risque de malignité : le GAPP score (Grading for pheochromocytoma and paraganglioma). Ce système à points, utilise certaines données

morphologiques utilisées pour l'établissement du score de PASS et y ajoute la prise en compte du profil sécrétoire des tumeurs. Cette classification permet de classer les tumeurs en trois groupes, « bien différencié » (score 0-2), « modérément différencié » (score 3-6) ou « faiblement différencié » (score 7-10) ; le statut de différenciation étant inversement corrélé au risque de malignité. Bien que prometteur, ce nouvel outil mis en œuvre par un seul groupe et un seul observateur doit être maintenant confirmé par d'autres équipes. De plus, sa reproductibilité inter- et intra- observateurs reste à évaluer. Par ailleurs la prise en compte du statut SDHB (dont on sait aujourd'hui qu'il a un impact fort sur le risque de malignité) pourrait être un plus pour l'amélioration de ce score [38, 39].

b. *Marqueurs histologiques*

Parmi les méthodes envisagées pour distinguer les tumeurs bénignes des tumeurs malignes, l'immunohistochimie a été largement utilisée. Elle permet en effet d'étudier l'expression de cibles multiples ainsi que leur fonctionnalité. Des marqueurs de prolifération et de croissance cellulaire, des indicateurs de l'inhibition de la croissance et de l'apoptose, des marqueurs de l'angiogenèse et de la vascularisation ainsi que des marqueurs de métastases et d'invasion ont été testés. Aucun de ces marqueurs ne s'est révélé être un bon indicateur pour identifier les tumeurs malignes dans les études qui sont listées dans les Tables 5 et 6.

Certains se sont révélés inutilisables, du fait de spécificités et de sensibilités de détection trop faibles. D'autres sont plus informatifs, mais ne constituent que des indicateurs de malignité. Ces marqueurs informatifs nécessiteraient malgré tout une validation sur des cohortes plus larges, de manière prospective, et en tenant compte du statut génétique des tumeurs, fortement corrélé avec leur statut de malignité (voir ci-après).

	Marqueur	Nb cas (B/M)	Critères	Bénins	Malins	Spécificité	Sensibilité	Référence
1. Croissance et prolifération	Ki-67	51 (45/6)	Immunoréactivité $\geq 1\%$	0%	50%	100%	50%	[40]
		136 (99/37)	Immunoréactivité $\geq 2,5\%$	0%	50%	100%	50%	[41]
		45 (34/11)	Immunoréactivité $\geq 1\%$	0%	38%	100%	38%	[42]
		99 (92/7)	Immunoréactivité $\geq 5\%$	25%	85%	75%	85%	[43]
		63 (43/20)	Immunoréactivité $\geq 5\%$	0%	85%	100%	85%	[44]
		45 (40/5)	Immunoréactivité $\geq 2\%$	5 %	40 %	95%	40%	[29]
		55(44/11)	Immunoréactivité $\geq 1\%$	0%	100%	100%	100%	[45]
	Ploïdie	184 (178/6)	Aneuploïde / Diploïde / Tétraploïde (% / % / %)	32% / 36% / 32%	33% / - / 67%	64%	100%	[46]
		26 (25/1)	Aneuploïde / Diploïde / Tétraploïde (% / % / %)	8% / 60% / 32%	- / 100% / -	40%	0%	[47]
		23 (22/1)	Contenu en ADN (N)	2,6-2,75 N	4,24 N	-	-	[48]
		51 (45/6)	Aneuploïde / Diploïde / Tétraploïde (% / % / %)	38% / 18% / 44%	- / 33% / 66%	82%	66%	[40]
	c-ErbB2	34 (25/9)	Immunoréactivité ($\leq 30\%$ / 30-50% / $\geq 50\%$)	32% / 40% / 28%	- / 100% / -	72%	0%	[49]
		104 (77/27)	Immunoréactivité ($\leq 5\%$ / 10-50% / $\geq 50\%$)	12% / 32% / 56%	19% / 37% / 44%	44%	44%	[50]
		39 (32/7)	Immunoréactivité (0% / $\leq 30\%$ / 30-60% / $\geq 60\%$)	53% / 16% / 28% / 3%	0% / 14% / 57% / 29%	97%	29%	[51]
		55 (44/11)	Immunoréactivité ($< 50\%$ / $\geq 50\%$)	89% / 11%	27% / 73%	89%	73%	[45]
	hTERT	19 (16/3)	Activité télomérase (positive, %)	0%	100%	100%	100%	[52]
		37 (28/9)	Activité télomérase (positive, %)	0%	100%	100%	100%	[53]
		34 (23/11)	Activité télomérase (positive, %)	4%	45%	96%	45%	[42]
	HSP90	37 (28/9)	Score Remmele (0-3 / 3-6 / < 6)	15 % / 85% / 0%	0% / 0% / 100%	100%	100%	[54]
		94 (76/18)	Immunoréactivité positive	22%	67%	78%	67%	[55]
2. Inhibition de la croissance et apoptose	p53	25 (21/4)	Immunoréactivité positive ($> 10\%$)	5%	0%	95%	0%	[56]
		33 (23/10)	Immunoréactivité positive	20%	4%	80%	4%	[57]
		99 (77/22)	Immunoréactivité positive	18,5%	5%	92,5%	5%	[50]
		65 (52/13)	Immunoréactivité positive	6%	8%	94%	8%	[58]
		105 (97/8)	Immunoréactivité positive ($> 10\%$)	9%	25%	91%	25%	[43]
		51 (31/20)	Immunoréactivité positive	0%	12%	100%	12%	[59]
		48 (43/5)	Immunoréactivité positive	2,5%	0%	97,5%	0%	[29]
	MDM2	65 (52/13)	Immunoréactivité positive	63%	31%	63%	69%	[58]
		48 (43/5)	Immunoréactivité positive	10%	0%	90%	0%	[29]
	RB	65 (52/13)	Immunoréactivité négative	37%	23%	63%	23%	[58]
	p21	105 (97/8)	Immunoréactivité positive ($> 10\%$)	2%	0%	98%	0%	[43]
		48 (43/5)	Immunoréactivité positive	10%	20%	90%	20%	[29]
	CyclinD1	48 (43/5)	Immunoréactivité positive	70%	60%	30%	60%	[29]
	BCL2	104 (78/26)	Immunoréactivité positive	33%	58%	77%	58%	[50]
	COX-2	98 (84/14)	Immunoréactivité ($< 1\%$ / 1-19% / 20-49% / $\geq 50\%$)	19% / 41% / 14% / 26%	0% / 21,5% / 21,5% / 57%	74%	57%	[60]
		41 (30/11)	Immunoréactivité (0% / $\leq 25\%$ / 25-50% / $\geq 50\%$)	46% / 19% / 19% / 16%	10% / 10% / 20% / 60%	84%	60%	[61]
		92 (76/18)	Immunoréactivité $> 50\%$	24%	83%	76%	83%	[62]
		55 (44/11)	Immunoréactivité ($\leq 10\%$ / 11-40% / 41-70 / $\geq 71\%$)	77% / 5% / 7% / 11%	18% / 18% / 0% / 64%	89%	64%	[63]
	inhibine β B	83 (76/7)	Immunoréactivité (0% / $\leq 1-10$ / 11-50% / $\geq 51\%$)	20% / 11% / 22% / 47%	14% / 86% / 0% / 0%	69%	100%	[64]
	IGF-1R	40 (29/11)	Immunoréactivité (faible / intense)	62% / 38%	9% / 91%	62%	91%	[65]

Table 5 : Récapitulatifs des différents marqueurs histologiques proposés pour la distinction des PCC/PGL bénins et malins

	Marqueur	Nb cas (B/M)	Critères	Bénins	Malins	Spécificité	Sensibilité	Référence
1. Angiogenèse	VEGF	20 (15/5)	Surface immunoréactive (%)	23 ± 6,9%	37,1 ± 10,9	-	-	[66]
		105 (97/8)	Immunoréactivité (0% / ≤10% / 11-50% / ≥51%)	14% / 30% / 29% / 27%	0% / 0% / 38% / 62%	73%	62%	[67]
	CD34	19 (10/9)	Architecture vasculaire anormale	10%	100%	90%	100%	[68]
		20 (15/5)	Densité de la surface vasculaire	13,45 ± 3,3	26,2 ± 8,0	-	-	[66]
		105 (97/8)	Densité micro-vasculaire (/mm ²)	330,45	346,95	-	-	[67]
		92 (76/18)	Densité micro-vasculaire	21,43%	36,41%	-	-	[63]
	SNAIL	50 (32/18)	Immunoréactivité (0 / <20% / 20-70% / >70%)	56% / 32% / 9% / 3%	0% / 11% / 33% / 56%	88%	89%	[69]
		52 (35/17)	Immunoréactivité (<5% / 5-50% / ≥50%)	83% / 6% / 11%	29% / 53% / 18%	89%	71%	[70]
	TWIST1	52 (35/17)	Immunoréactivité (<5% / 5-50% / ≥50%)	43% / 34% / 23%	6% / 35% / 59%	67%	59%	[70]
	N-cadhérine	35 (27/8)	Immunoréactivité (0 / 1-24% / 25-75% / >75%)	56% / 15% / 22% / 7%	0% / 38% / 12% / 50%	56%	100%	[71]
2. Invasion	E-cadhérine	51 (34/17)	Immunoréactivité (<5% / 5-50% / ≥50%)	97 % / 3% / 0%	100% / 0% / 0%	97 %	0 %	[70]
	Stathmine	139 (90/49)	Score (intensité et nombre de cellules positives)	1,62	1,89	-	-	[72]
		37 (29/8)	Score (intensité et nombre de cellules positives)	2,6	4,9	-	-	[73]
	Tenascine	103 (96/7)	Immunoréactivité (≤15 / 5-25% / 26-50 / ≥51%)	23% / 36% / 24% / 17%	0% / 29% / 14% / 57%	83%	57%	[74]
	nm-23	55 (44/11)	Immunoréactivité (≤10% / 11-40% / 41-70 / ≥71%)	7% / 16% / 18% / 59%	64% / 0% / 0% / 36%	79%	64%	[62]
	Galectin-3	55 (44/11)	Immunoréactivité (≤10% / 11-40% / 41-70 / ≥71%)	89% / 5% / 2% / 5%	18% / 18% / 27% / 36%	93%	63%	[62]
	HPA-1	92 (76/18)	Immunoréactivité >50%	24%	78%	76%	78%	[63]
	CD44	43 (23 /20)	Immunoréactivité (0 / <10% / 10-50% / >50% / 100%)	22% / 19% / 29% / 14% / 22%	75% / 5% / 10% / 0% / 10%	78%	75%	[44]

Table 6 : Récapitulatif des différents marqueurs histologiques proposés pour la distinction des PCC/PGL bénins et malins

Marqueurs associés à la croissance et prolifération

Parmi les indicateurs de prolifération et de croissance (que l'on s'attend à trouver augmentés ou induits dans les tumeurs métastatiques), l'index de prolifération Ki-67, les anomalies de ploïdies, la surexpression de l'oncogène c-ERBB2 ou encore celle de la télomérase ont été mesurés dans les PCC/PGL (cf. Table 5.1).

- Le **Ki-67** est un antigène de protéine nucléaire, dont l'abondance est importante au cours des phases G1 à S, il est ensuite dégradé en fin de mitose. Sa détection permet donc de visualiser les noyaux cellulaires en division. Largement utilisé pour de nombreux types de cancers, il est peu informatif dans les PCC/PGL qui se divisent peu (quel que soit le statut de bénin/malin). Bien que spécifique, son utilisation est peu sensible pour différencier les PCC/PGL bénins et malins [29, 40-45].
- Les **anomalies de ploïdie**, notamment l'aneuploïdie, ont été décrites dans les années 80 comme associées à la malignité des tumeurs. Les données concernant les PCC/PGL comportent très peu d'échantillons malins, et se révèlent non concluantes [40, 46-48].
- **c-ERBB2** est une protéine codée par un oncogène. Ce récepteur à activité TK est capable d'induire une signalisation cellulaire responsable de la prolifération cellulaire. Les amplifications et les mutations activatrices de ce gène sont associées à un mauvais pronostic dans les tumeurs mammaires. Quelques études ont porté sur l'expression de c-ERBB2 dans les PCC/PGL, l'analyse de plus de 200 échantillons montre une grande variabilité, et une impossibilité de distinction des tumeurs bénignes et malignes grâce à ce marqueur [45, 49-51].
- La sous-unité catalytique de la télomérase : la protéine **hTERT**, normalement active uniquement dans les cellules germinales et dans les cellules souches, peut être réactivée dans les cellules cancéreuses. Elle permet d'allonger la taille des télomères, et inhibe ainsi l'entrée en sénescence et l'arrêt de la prolifération des cellules. L'analyse de 90 échantillons montre des résultats très divergents en ce qui concerne les PCC/PGL. Les deux études en faveur de ce marqueur étant celles comportant le moins d'échantillons [42, 52, 53].
- La protéine **HSP90** est une chaperonne moléculaire induite en réponse au stress cellulaire, et impliquée dans la régulation de la conformation, de l'activité, de la fonction et de la stabilité des protéines. De par son interaction directe avec hTERT, elle est considérée comme une sous unité de la télomérase. Décrite comme surexprimée dans certains cancers, elle ne se révèle pas un bon outil pour les PCC/PGL. Les résultats sont, en effet, différents selon les seuils utilisés, et évalués sur un nombre limité de tumeurs ce qui ne permet pas de conclure [54, 55].

Marqueurs associés à l'inhibition de la croissance et de l'apoptose

La recherche de cibles inhibitrices de la croissance cellulaire ou encore inductrices de l'apoptose, (pour lesquelles une diminution est attendue dans les tumeurs les plus agressives) n'a pas permis de mettre en évidence de prédicteurs de malignité des PCC/PGL. La contradiction des résultats, et les manques de spécificité et de sensibilité de ces marqueurs ne permettant pas de conclure, ni d'établir avec certitude une différence entre les tumeurs bénignes et malignes. De plus certains marqueurs n'ont été étudiés que dans de rares études, sur des nombres d'échantillons restreints (cf. Table 5.2).

- **p53**, qui interagit avec p21, est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire (en cas de dommage à l'ADN, d'anomalies du cycle cellulaire ou encore d'anomalie du métabolisme) et de

l'induction de l'apoptose. La demi-vie de la protéine (de quelques minutes en conditions normales) est allongée en cas de mutation du gène *TP53*, ce qui permet la détection de p53 sur des coupes de tissus. La détection de la protéine est globalement très faible sur les coupes de PCC/PGL. Cette technique est ainsi très peu sensible [29, 43, 50, 56-59].

- **MDM2** est une ubiquitine ligase de type E3, responsable de l'ubiquitination et donc de la dégradation de p53. L'immunomarquage MDM2, n'est pas concluant pour isoler les PCC/PGL malins [29, 58].
- La protéine **RB**, codée par le gène suppresseur de tumeur *RB*, est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. C'est également une cible de MDM2, perdue dans certains types de cancers (notamment les rétinoblastomes). Sa détection n'est ni sensible ni spécifique pour établir le statut de malignité des PCC/PGL [58].
- La **cycline D1**, est une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, et notamment de la transition G1-S. Exprimée dans quasiment toutes les tumeurs, elle ne permet pas la distinction des PCC/PGL bénins et malins, cependant une seule étude rapporte son expression [29].
- **Bcl2** est une protéine oncogénique impliquée dans la régulation négative de l'apoptose. Une étude rapporte son utilisation pour la prédiction de la malignité des PCC/PGL, qui s'avère inutilisable [50].
- La **cyclooxygénase 2** (COX2) est une enzyme responsable de la biosynthèse des prostaglandines, également connue pour induire une résistance à l'apoptose. De ce fait sa surexpression est associée à un mauvais pronostic comme cela a été décrit dans certains cancers solides. Les différentes études portant sur son expression dans les PCC/PGL ne permettent pas de conclure à son utilité, le marquage n'étant si sensible ni spécifique [60-63].
- L'**inhibineβB** est une glycoprotéine de la famille du TGFβ, ayant un rôle dans la sécrétion de la FSH. Elle est également décrite pour son implication dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de l'apoptose et du métabolisme cellulaire. Bien que sensible, cet immunomarquage n'est cependant pas spécifique des tumeurs bénignes [64].
- **IGF-1R**, est un récepteur aux facteurs de croissance apparentés à l'insuline. IGF-1R est associée à la régulation du cycle cellulaire ainsi qu'à l'inhibition de l'apoptose. Une seule étude (comportant 40 patients) fait état de son utilisation comme marqueur histologique de malignité des PCC/PGL, ce qui ne permet pas de conclure de façon certaine [65].

Marqueurs associés à l'angiogenèse

Les défauts de vascularisation fonctionnelle sont décrits comme pouvant induire l'échappement tumoral et le processus métastatique. Des cellules capables de résister à l'hypoxie et aux faibles apports en nutriments peuvent en effet être sélectionnées et survivre dans une tumeur anormalement vascularisée. Les PCC/PGL sont des tumeurs hautement vascularisées, mais paradoxalement l'analyse de la vascularisation et de l'angiogenèse s'est révélée un bon critère pour distinguer les tumeurs bénignes des tumeurs malignes. En effet l'étude de Favier et al. parue en 2002 décrit une architecture vasculaire atypique (composée de longs segments irréguliers, de réseaux désorganisés et d'arcs) dans les tumeurs malignes comparativement aux tumeurs bénignes dont les vaisseaux sont petits, réguliers et disposés uniformément sur toute la surface tumorale. Ceci permet avec une très bonne spécificité et une excellente sensibilité d'isoler les tumeurs malignes. Cette

mesure qualitative est d'ailleurs plus efficace que les mesures quantitatives de vascularisation (densité vasculaire, VEGF) (*cf.* Table 6.1).

- Le **VEGF** est un facteur de croissance mitogène spécifique des cellules endothéliales, sa sécrétion par les cellules tumorales permet l'induction de la néo-vascularisation tumorale. Son expression protéique ne permet pas la distinction des tumeurs bénignes et malignes [66, 67].
- **CD34** est une glycoprotéine, exprimée la surface des cellules hématopoïétiques et des tissus associés au système vasculaire. Tout comme l' α -actine, cet immunomarquage est fréquemment utilisé pour mettre en évidence les cellules endothéliales sur les coupes d'échantillons tumoraux. La quantification de la densité vasculaire ne permet pas de distinguer les tumeurs malignes, mais l'architecture vasculaire se révèle un outil, très spécifique et très sensible [63, 66-68].

Marqueurs associés à l'invasion

Les protéines impliquées dans les processus d'invasion et de métastases sont de potentiels marqueurs de malignité innovants et informatifs, pour lesquels une induction ou une surexpression est attendue dans les tumeurs malignes. Des facteurs de transcription inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires, dans la régulation du cytosquelette, ou encore dans la composition de la matrice extracellulaire ont ainsi été suggérés. La majorité de ces marqueurs a été étudiée de façon isolée, dans des cohortes de taille réduite, ce qui ne permet donc pas de conclure quant à leur utilisation en routine pour le diagnostic de malignité des PCC/PGL. Par ailleurs, au sein même de ces études uniques, ils ne permettent pas de distinguer les tumeurs malignes avec une sensibilité et une spécificité importantes (*cf.* Table 6.2).

- La surexpression de **SNAI1** et **TWIST1**, deux facteurs de transcription inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, est décrite pour être associée à un phénotype invasif, et au mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers. Deux études ont suggéré leurs surexpressions dans les PCC/PGL malins, sans que celles-ci ne permettent l'isolation des tumeurs malignes. Cependant aucune des deux études ne tient compte de la localisation des protéines pour conclure, ce qui peut induire un biais dans l'interprétation de ces résultats. Ces protéines étant des facteurs de transcription, une surexpression cytoplasmique n'est pas équivalente à une surexpression nucléaire [69, 70].
- Les **cadhérines** sont des protéines impliquées dans la formation des jonctions cellulaires, elles sont importantes pour la différenciation cellulaire et le maintien de la structure et de l'intégrité tissulaire. La E-cadhérine est exprimée dans les cellules épithéliales, on retrouve la N-cadhérine dans les cellules neuronales. La E-cadhérine n'est pas exprimée dans les PCC/PGL, tandis que la N-cadhérine est exprimée de façon variable. On pourrait s'attendre à une diminution de la N-cadhérine dans les tumeurs malignes, or une étude a suggéré qu'une surexpression de cette protéine pourrait être associée à la malignité [70, 71].
- Les **stathmines** sont des protéines accessoires des microtubules (responsables de la stabilité architecturale et mécanique des cellules *via* leurs interactions avec les filaments d'actine et les filaments intermédiaires). Les stathmines séquestrent la tubuline, bloquent la polymérisation et favorisent la dépolymérisation des microtubules, ce qui modifie la prolifération et la différenciation cellulaire. De hauts niveaux de stathmines ont été décrits dans de nombreux types de cancers, mais les deux études portant sur les PCC/PGL ne

montrent pas de différences majeures entre les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes [72, 73].

- La **ténascine** est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, dont la séquence comporte des motifs équivalents aux motifs EGF (epithelial growth factor), qui lui permettent d'interagir avec les récepteurs EGFR, et d'induire une signalisation cellulaire et d'activer des processus invasifs et métastatiques dans différents types de néoplasmes (sein, ovaire, colon ...). Dans les PCC/PGL une seule étude décrit son induction dans les tumeurs malignes, avec cependant une faible sensibilité [74].
- L'**héparinase-1** (HPA-1) est une enzyme responsable de la dégradation des protéoglycannes composant la matrice extracellulaire. Sa surexpression est corrélée à un mauvais pronostic et à un phénotype cellulaire invasif. La détection de cette protéine n'est ni très spécifique ni très sensible pour détecter les PCC/PGL malins [63].
- **nm-23** est une protéine suppresseur de métastases, dont la diminution d'expression est associée à un phénotype invasif. Les galectines sont impliquées dans la transformation cancéreuse et la progression tumorale. Ces deux protéines ont été étudiées dans une seule étude comportant peu d'échantillons, elles ne permettent pas de prédire la malignité des PCC/PGL avec sensibilité et spécificité [62, 63].
- **CD44** est une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules. Elle est impliquée dans les interactions entre cellules, l'adhésion et la migration cellulaire. Son expression a été rapportée dans une étude, comme plus faible dans les PCC/PGL malins [44].

c. *Dosages biologiques*

La persistance de dosages hormonaux anormalement élevés après résection de la tumeur primaire est un indicateur de récurrence ou de la présence de métastases. De nombreuses études se sont ainsi intéressées aux catécholamines et à leurs métabolites, comme possibles marqueurs diagnostiques des tumeurs malignes.

L'ensemble des études s'accordent à décrire une forte association de la malignité avec un profil sécrétoire dopaminergique (que l'on retrouve principalement dans un contexte de mutation sur le gène *SDHB*). Les patients atteints de tumeurs malignes présentent dans la majorité des cas une augmentation de l'excrétion urinaire et une augmentation de la concentration plasmatique ou urinaire en MTY (dont le dosage présente une meilleure sensibilité que celui de la dopamine) [10, 34, 75-78]. Les tumeurs malignes sont également caractérisées par une tendance à la sécrétion de NAd et de son métabolite la NMN, plutôt que par la sécrétion d'Ad et de MN (généralement plus faibles comparativement aux tumeurs bénignes). Ceci est le reflet d'une différenciation tumorale moins importante dans les tumeurs malignes, ayant pour conséquences une absence des enzymes les plus en aval de la voie de biosynthèse des catécholamines comme la PNMT. Ce défaut de différenciation peut notamment être mis en évidence par le ratio Ad / (Ad + NAd), diminué dans les tumeurs malignes [77, 78].

D'autres marqueurs tels que la chromogranine A (co-stockée et co-sécrétée avec les catécholamines), la ALAAD (décarboxylase des L-acides aminés aromatiques) ou la DBH (dopamine β -hydroxylase), deux enzymes de la voie de biosynthèse des catécholamines, ont été suggérés comme indicateur de malignité par van der Harst et al. Seule l'ALAAD s'est révélée un indicateur potentiel de malignité. Cependant cette enzyme n'a été étudiée que dans une seule étude, sur seulement 14 tumeurs malignes [77].

d. Autres

Altérations génomiques

Différentes études ont été menées sur les altérations génomiques présentes dans les PCC/PGL. Elles révèlent que ces tumeurs présentent plus d'évènements de pertes chromosomiques que de gains. En ce qui concerne les différences entre les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes, ces études n'aboutissent cependant pas aux mêmes conclusions. Toutes s'accordent sur la présence d'un nombre d'altérations plus important dans les tumeurs malignes, mais l'ensemble de la littérature ne permet pas d'aboutir à une signature génomique permettant de distinguer les tumeurs bénignes des tumeurs malignes.

Certaines régions sont perdues de façon récurrentes dans toutes les tumeurs (loci 1p et 3p) et sont décrites comme responsables de la tumorigenèse précoce des PCC/PGL, d'autres sont décrites comme significativement perdues (*cf.* Table 7) ou gagnées (*cf.* Table 8) dans les PCC/PGL malins. Cependant, mises à part quelques régions retrouvées perdues (loci 11q, 11p, 6q et 17p) ou gagnées (loci 12q, 17q, 19q et 20q) dans plusieurs études indépendantes, les autres ne le sont que dans une seule étude. Par ailleurs, ces régions sont retrouvées plus fréquemment perdues ou gagnées dans les tumeurs malignes, mais ces évènements sont également retrouvés dans des tumeurs bénignes (de façon plus rare). De ce fait, ces données ne sont pas utilisables pour poser un diagnostic de malignité.

	1p	3p	4q	6q	9p	10p	11p	11q	17p	21q	22q	Référence
Dannenberg et al.												[79]
Edstrom et al.												[80]
August et al.												[44]
Cascon et al.												[81]
Yuan et al.												[51]
Petri et al.												[59]
Sandgren et al.												[82]
Burnichon et al.												non publié

Table 7 : Pertes chromosomiques rapportées dans les tumeurs malignes comparativement aux tumeurs bénignes

	6p	7p	9q	11q	12p	12q	17q	19q	20q	Référence
Dannenberg et al.										[79]
Edstrom et al.										[80]
August et al.										[44]
Cascon et al.										[81]
Yuan et al.										[51]
Petri et al.										[59]
Sandgren et al.										[82]
Burnichon et al.										non publié

Table 8 : Gains chromosomiques rapportés dans les tumeurs malignes comparativement aux tumeurs bénignes

Micro-ARNs

Les micro-ARNs (miRs) sont de petits ARN non-codants de 18 à 22 pb. Ils sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes, *via* leur interaction spécifique avec leurs ARN messagers cibles, dont ils induisent la dégradation ou inhibent la traduction. Leur dérégulation est maintenant largement décrite dans de nombreux types de cancers, et la possibilité de les doser dans le sang des patients en fait de potentiels marqueurs facilement détectables.

Trois études se sont intéressées aux micro-ARNs dans les PCC/PGL. Seules deux d'entre elles rapportent respectivement 18 et 8 miRs comme étant différentiellement exprimés entre les PCC/PGL

bénins et malins [83, 84] (cf. Table 9). Dans ces deux études, des cohortes indépendantes ont été utilisées pour valider les résultats obtenus par qPCR. Malgré tout, un seul miR parmi les 26 identifiés est commun aux deux analyses, le miR483-5p. Déjà décrit comme surexprimé dans d'autres types de cancers, sa fonction reste néanmoins inconnue, à la différence des miRs 16 et 15a identifiés par Meyer-Rochow et al., dont les résultats, obtenus avec les cellules PC12 (un modèle cellulaire de PCC largement utilisé dans les laboratoires, dérivé d'un phéochromocytome de rat, cf. Section Résultats et discussions, Paragraphe III. 1. 1) suggèrent une implication dans la régulation de l'induction de l'apoptose, et l'inhibition de la transition G₁/S [83]. Dans la troisième étude, De Cubas et al. se sont intéressés aux différences d'expression des miRs dans les PCC/PGL en fonction de leur génotype, et n'ont pas mis en évidence de différence entre les tumeurs bénignes et malignes. En revanche, ils décrivent une surexpression du miR 183 dans les tumeurs *SDHB*-mutées, également mise en évidence par Patterson et al. dans les tumeurs malignes, suggérant une possible signature *SDHB*-maligne (voir Chapitre II) [85].

	miRs différentiellement exprimés	Référence
Meyer-Rochow et al.	Bénins vs. Malins : <ul style="list-style-type: none"> - Surexprimés : miR603, miR483-5p, miR431, miR138.1, miR574-3p, miR483-3p, miR877, miR766 - Sous-exprimés : miR451, miR144, miR16, miR19b, miR15a, miR577, miR33a, miR887 	[83]
Patterson et al.	Bénins vs. Malins : <ul style="list-style-type: none"> - miR183, miR483-5p, miR513a-5p, miR710, miR101 	[84]
De Cubas et al.	<i>SDHB</i> vs non-<i>SDHB</i> : <ul style="list-style-type: none"> - Surexprimés : miR183, miR630, miR551b, miR96 - Sous-exprimés : miR146b-5p <i>SDHB/VHL</i> vs Autres : <ul style="list-style-type: none"> - Surexpression miR210 	[85]

Table 9 : Récapitulatifs des différences d'expressions de miRs dans les PCC/PGL

6. Prise en charge thérapeutique

Une fois le PCC/PGL détecté et localisé, la prise en charge peut se faire selon différentes approches thérapeutiques, qui seront choisies et adaptées à chaque patient en fonction du contexte : tumeur métastatique ou non, génétiquement déterminée ou non, unique ou multiple.

A. La chirurgie

La chirurgie, lorsqu'elle est envisageable (localisation anatomique permettant une opération, absence de tumeurs ou de métastases multiples), est le seul traitement curatif du PCC/PGL. Elle reste un acte complexe, qui nécessite une prise en charge des particularités associées à ce type de tumeurs. Une préparation médicale est nécessaire en préopératoire, afin de contrôler l'HTA et le rythme cardiaque. Il convient en effet d'éviter les complications dues aux décharges de catécholamines associées aux manipulations tumorales et à l'anesthésie. Un traitement généralement à base d' α -bloquants (phénoxybenzamine) est préconisé pour ses effets anti-hypertensifs à long terme ; des β -bloquants peuvent également être prescrits pour contrecarrer la tachycardie induite par les α -bloquants (propanolol, atenolol, metoprolol). Pour les PCC, en l'absence de complication au préalable et si la taille tumorale le permet, la résection tumorale s'effectue par laparoscopie, qui est moins invasive ; elle présente donc moins de complications post-opératoires et

est plus facilement tolérée par les patients. En cas de tumeurs bilatérales, une adrénalectomie bilatérale peut être pratiquée, nécessitant une supplémentation à vie en hormones corticoïdes (minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes). Pour les PGL, le type de chirurgie dépend de la localisation (cervicale ou thoraco-abdomino-pelvienne) et des habitudes chirurgicales [86]. La chirurgie peut également être une alternative palliative, en cas de complications locorégionales dues à la masse tumorale ; elle peut également être réductrice, pour limiter les conséquences fonctionnelles associées aux fortes sécrétions hormonales dans les cas de formes malignes [87].

Il n'existe pas de traitement curatif pour les tumeurs non résécables ou multi-métastatiques. Différentes options palliatives sont disponibles, et sont adaptées en fonction des caractéristiques tumorales.

B. La radiothérapie métabolique

La radiothérapie métabolique consiste en l'administration d'agents radioactifs capable de cibler de façon spécifique les cellules cancéreuses. Les radionucléides émettent des rayons induisant l'élimination des cellules. Les molécules utilisées sont généralement les mêmes que pour la détection des tumeurs, avec des isotopes radioactifs différents.

Pour les tumeurs métastatiques fixant l' ^{123}I -MIBG (critère objectivé par la scintigraphie), la radiothérapie à l' ^{131}I -MIBG est généralement prescrite. La MIBG est un analogue de la noradrénaline, capable de se lier aux récepteurs post-synaptiques. Elle est assimilée et stockée suivant un mécanisme équivalent à celui des catécholamines, de ce fait elle se retrouve concentrée dans les vésicules de stockage des cellules chromaffines. Ce type de traitement utilisé depuis le début des années 1980 a notamment été rapporté en 1997 par Loh et al. et décrit comme permettant un contrôle des symptômes [88]. Des réponses totales sont très rares, la majorité des patients présentant une réponse partielle (au niveau tumoral ou au niveau hormonal), qui se traduit communément par une progression au bout de 2 ans. Par ailleurs, il n'a pas pu être démontré de bénéfice pour les patients à combiner la radiothérapie à l' ^{131}I -MIBG avec la chimiothérapie [88-90].

Les SSR étant fortement exprimés à la surface des cellules neuroendocrines, des analogues de somatostatine (octréotide, lanréotide, pasiréotide) ont été développés et sont utilisés pour le traitement de tumeurs neuroendocrines de type carcinoïdes (notamment des tumeurs gastro-intestinales métastatiques) [91]. Bien qu'utilisées pour la localisation de ces tumeurs en imagerie fonctionnelle, l'efficacité de ces molécules n'a pas été prouvée dans le traitement des PCC/PGL [87, 92].

C. La chimiothérapie

La chimiothérapie classiquement utilisée pour le traitement des PCC/PGL métastatiques se compose de molécules antinéoplasiques, visant à éliminer les cellules en division. Dans le cadre des PCC et des PGL, le faible nombre de patients rend les essais cliniques randomisés difficiles à mettre en place et difficilement interprétables. Ainsi, il n'existe pas de réelles indications pour une chimiothérapie, les conclusions sont faibles et les résultats rarement significatifs.

Cependant, en 1985, Keiser introduisit la combinaison de trois drogues (déjà utilisées notamment pour le traitement de neuroblastome), pour le traitement des PCC et des PGL. Cette combinaison comporte de la cyclophosphamide, un agent alkylant ; de la vincristine, un alcaloïde inhibant la

polymérisation des microtubules ; et de la dacarbazine, un antinéoplasique cytostatique. Cette association cyclophosphamide-vincristine-dacarbazine, aussi appelée CVD est aujourd'hui la principale association utilisée pour les PCC/PGL. Elle induit une réponse partielle, avec une réduction de la sécrétion de catécholamine. Elle n'induit en revanche pas d'amélioration de la survie des patients [87, 93].

D. Autres

En cas de rechute, de tumeurs ou métastases non opérables, des traitements locorégionaux peuvent être proposés. Cependant, ces traitements sont palliatifs et ne permettent pas de prise en charge curative de la maladie.

- Les métastases osseuses douloureuses, compressives ou à risque de fractures peuvent par exemple être traitées par radiothérapie externe, ou par vertébroplastie [87, 94].
- Les métastases hépatiques, lorsqu'elles sont bien isolées, peuvent quant à elles être prise en charge par cryoablation, par radiofréquence, ou encore être embolisées [87, 94].
- Les formes ORL de la maladie peuvent être prises en charge par radiothérapie externe, lorsque les tumeurs sont de classe II ou III selon la classification Shamblin (contact partiel, présence d'adhérences, ou englobement complet de la bifurcation carotidienne) ou C selon la classification de Netterville-Glasscock (extension tumorale au foramen jugulaire ou extension crânienne) [5, 95].
- Les formes les plus progressives peuvent être incluses dans des essais cliniques.
- Les formes à progression lente peuvent bénéficier d'une surveillance simple.

Des options thérapeutiques existent donc pour ces patients atteints d'une forme métastatique de la maladie, cependant aucune n'est aujourd'hui curative. Dans tous les cas, les patients bénéficient d'un suivi à vie afin de surveiller l'évolution de leur maladie. L'avenir pour ces patients repose donc sur l'émergence de la médecine personnalisée. La connaissance du statut génétique des patients qui reflète les spécificités de tumorigenèse permet en effet aujourd'hui d'envisager pour les patients des thérapies dites « ciblées », adaptées à chacun (voir Paragraphe 9. Tumorigenèse des PCC/PGL).

7. Génétique du phéochromocytome/paragangliome

Les formes génétiquement déterminées de tumeurs ou de cancers sont caractérisées par des mutations sur des gènes de prédisposition, qui ségrègent dans les familles. Dès la fin des années 1970, Stehelin (en 1976) puis Knudson (en 1978), ont montré que ces gènes pouvaient être de différentes natures, notamment en fonction des événements qu'ils avaient à subir pour induire la cancérogenèse [96, 97]. Les proto-oncogènes sont activés dans les cellules cancéreuses (leur expression ou fonction se trouve augmentée ou induite). Ce phénomène a été mis en évidence dans des cas de leucémie ou de lymphome, où une translocation chromosomique somatique (détectable par un caryotype ou par une hybridation *in situ* en fluorescence, FISH) place un proto-oncogène sous contrôle d'un promoteur fort, induisant ainsi son expression. On parle alors de tumeurs à « one hit », puisque ce seul événement permet la transformation cellulaire et donc la cancérogenèse. Cet événement unique peut également être une mutation ponctuelle, activatrice, qui va maintenir la protéine codée par le gène dans un état actif, fonctionnel quel que soit le contexte cellulaire et

physiologique. Ces mutations peuvent être héritables, leur transmission se fait alors généralement selon un mode autosomique dominant [98].

La seconde catégorie, les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs (GST), sont à l'inverse inactivés dans les cellules cancéreuses. Cela nécessite donc deux mutations récessives, sur les deux allèles, pour induire l'inactivation complète du GST et le développement tumoral. Le premier événement est une mutation le plus souvent intra-génique, qui peut être présente constitutivement (elle est alors héritable et transmissible) ; elle peut également être somatique. Le second événement, du célèbre « double-hit » de Knudson, peut être une seconde mutation intra-génique, une délétion complète du gène, ou une perte chromosomique (par non disjonction des chromosomes ou par recombinaison somatique). En cas de délétion génique ou chromosomique, on parle de perte d'hétérozygotie (LOH). Le second événement étant statistiquement aussi probable qu'une mutation somatique (avec le même délai d'apparition), cela explique que les cancers avec mutations *de novo* se développent plus tardivement que les cancers avec prédisposition génétique [98]. Cette théorie du « two hits », démontrée initialement dans des cas du rétinoblastome (avec le gène *RB1*), a ensuite été étendue avec l'étude des neuroblastomes et des phéochromocytomes [99].

Dans certains types de tumeurs (comme c'est le cas pour certains cancers colorectaux), le développement d'une lésion tumorale maligne requiert la formation initiale d'une tumeur bénigne dans laquelle un ou plusieurs événements génétiques ont déjà eu lieu. La transformation maligne nécessite un autre événement indépendant (comme par exemple l'inactivation du gène *TP53*). On parle alors de tumorigenèse « multi-hit » [98].

Depuis 1990, année de l'identification du gène *NF1* comme étant le premier gène de prédisposition au phéochromocytome, la génétique du PCC/PGL n'a pas cessé d'évoluer. Ainsi, aujourd'hui, 16 gènes ont été impliqués dans la prédisposition héréditaire au PCC/PGL, et les mutations constitutionnelles sur ces gènes permettent d'expliquer plus de 40% des cas, faisant du PCC/PGL la tumeur humaine pour laquelle la proportion de formes héréditaires est la plus importante. Il a été démontré plus récemment que des mutations somatiques sur ces mêmes gènes pouvaient également induire le développement de PCC et de PGL, ces mutations expliquant 20-30% des cas, soit près de la moitié des tumeurs sporadiques [100, 101]. La cause génétique d'un PCC/PGL est donc désormais connue pour près de 70% des patients atteints de la maladie, quelle que soit la présentation, familiale ou sporadique.

A. Les présentations syndromiques

a. La neurofibromatose de type 1

Caractéristiques cliniques

La neurofibromatose de type 1 (NF1), ou maladie de Von Recklinghausen (OMIM #162200), du nom du clinicien qui la décrit pour la première fois en 1882, est une pathologie génétique de transmission autosomique dominante, avec une pénétrance le plus souvent complète dès l'âge de 5 ans. La maladie présente une très grande variété d'expression, et atteint dans les mêmes proportions toutes les populations ethniques, et aussi bien les hommes que les femmes [102]. L'incidence de la maladie est de 1/2500 naissances. Le diagnostic clinique repose sur la présence d'au moins deux critères caractéristiques de la pathologie [103], qui sont :

- un apparenté du premier degré atteint (parent, fratrie, enfant) ;
- au moins six taches café-au-lait (d'un diamètre supérieur à 1,5 cm après la puberté ou de plus de 0,5 cm avant la puberté) ;
- des lentigines axillaires ou inguinales (atteintes cutanées plus petite que les taches café-au-lait, qui apparaissent généralement plus tardivement) ;
- au moins deux neurofibromes cutanés ou un neurofibrome plexiforme ;
- au moins deux nodules de Lisch (seule manifestation oculaire de la NF1, pathognomonique de la maladie, et touchant 90% des patients dès l'âge de 6 ans) ;
- une lésion squelettique spécifique (pseudarthrose, dysplasie du sphénoïde, amincissement du cortex des os longs, pouvant entraîner des déformations osseuses au cours de la croissance) ;
- un gliome des voies optiques (chiasma et/ou nerf optique).

Les autres manifestations cliniques sont diverses et multiples. Il s'agit notamment de tumeurs associées, que l'on retrouve chez l'enfant (rhabdomyosarcome, leucémie et lymphome, leucémie myéloïde chronique, lymphome non-Hodgkinien), et chez l'adulte (tumeur sarcomateuse gastro-intestinale (GIST), phéochromocytome, carcinome mammaire, carcinome lobulaire, gliome). Par ailleurs, des mutations somatiques du gène *NF1* ont été fréquemment retrouvées dans différents types de cancers : adénocarcinome pulmonaire, carcinome pulmonaire à petites cellules, cancer colorectal ou ovarien, syndrome myélodysplasique ou encore astrocytome anaplasique [104, 105]. Chez les patients atteints de NF1, on retrouve également des macrocéphalies, des défauts cardiaques congénitaux, un phénotype « petite taille », des scolioses ou encore de l'arthrose, des complications d'ordre neurologique (retard d'apprentissage, troubles neuropsychologiques), une hypertension artérielle (secondaire à une sténose de l'artère rénale ou à un phéochromocytome) [106]. Le PCC est assez rare dans la NF1 (0,1 à 5,7% des patients atteints), on le retrouve classiquement isolé, avec un âge moyen au diagnostic de 42 ans [107].

Gène associé à la pathologie

Le gène responsable de la pathologie a été mis en évidence en 1990, par Wallace et al., localisé en 17q11.2 [108, 109]. C'est un gène suppresseur de tumeurs. Le gène *NF1* est un très grand gène qui s'étend sur 350 kb (58 exons), codant pour la neurofibromine, une protéine de 2839 acides aminés (aa) [110]. Il est soumis à épissage alternatif. Sa longueur et la présence de pseudo-gènes rendent difficile son étude par séquençage Sanger et le diagnostic de NF1 est le plus souvent posé sur la base de la présentation clinique. C'est un gène qui présente un très fort taux de néo-mutations, ce qui permet d'expliquer qu'environ 50% des cas de NF1 se développent en absence d'antécédents familiaux [111, 112]. Des mutations somatiques de *NF1* ont aussi été identifiées dans des cas de PCC/PGL [100].

Protéine codée par le gène NF1

La neurofibromine 1 est principalement connue pour son activité GAP (GTPase activating protein) spécifique de l'oncogène RAS [113]. Son domaine catalytique, le GRD (GAP related domain), est capable de lier la protéine RAS sous sa forme active, liée au GTP (Figure 9). L'hydrolyse du GTP en GDP faisant passer RAS d'un état actif à un état inactif [114], la neurofibromine est de ce fait décrite comme un inhibiteur de la voie RAS.

La neurofibromine est également capable d'interagir avec la tubuline, *via* son domaine TBD, et avec certaines kinases, *via* son domaine FAK, localisé en C-terminal et inclus en partie dans la séquence d'adressage nucléaire (NLS).

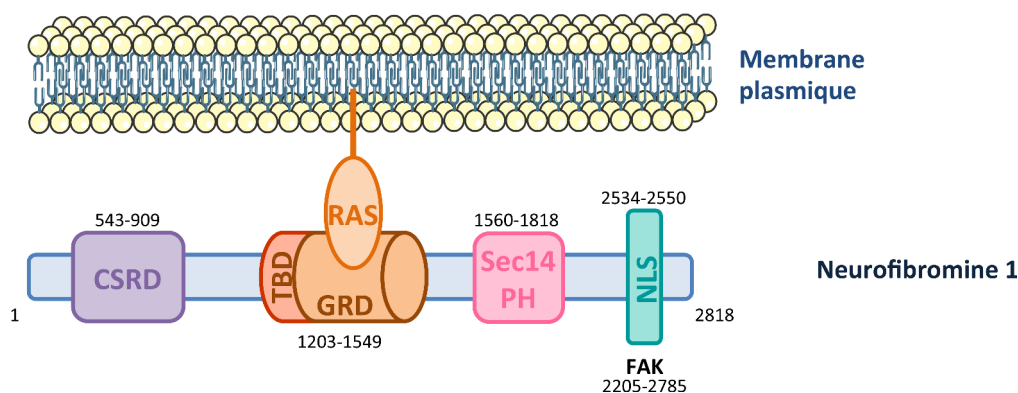


Figure 9 : Représentation schématique de la neurofibromine 1

Détail des sous domaines caractéristiques de la neurofibromine. CSRD : cysteine/serin-rich domain ; TBD : tubulin binding domain ; GRD : GAP related domain ; Sec14 : Sec14-homology domain ; PH : pleckstrin homology domain ; NLS : nuclear localization signal ; FAK : Focal adhesion kinase. Les nombres indiquent les positions des acides aminés. Adapté de Brossier, 2012 [115].

b. La néoplasie endocrinienne multiple de type 2

Caractéristiques cliniques

La néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM2) est une affection multi-glandulaire héréditaire, qui se transmet de manière autosomique dominante, avec une pénétrance complète. Cette pathologie dont la prévalence est de 1/5000 atteint des organes divers, mais ayant la même origine embryonnaire : les cellules de la crête neurale. Ces atteintes se caractérisent par une hyperplasie qui évolue vers l'adénome ou le carcinome. Il existe trois variations phénotypiques de la maladie, l'élément constant étant le carcinome médullaire de la thyroïde (CMT).

La première variation est la NEM2A (OMIM #171400), qui associe au CMT un PCC dans 20 à 50% des cas, une hyperparathyroïdie (dans 5 à 20% des cas) et de possibles affections cutanées (notalgia ou lichen amyloïde). Ce tableau clinique, aussi appelé syndrome de Sipple, est le plus courant, et représente 60% des NEM2.

La NEM2B, ou syndrome de Gorlin (OMIM # 162300), est caractérisé par un CMT, un PCC (dans la moitié des cas), une dysmorphie de type Marfan et une ganglioneuromatose digestive et sous-muqueuse. Cette forme plus rare, qui ne représente que 5% des NEM2, est la forme la plus agressive de la maladie.

Enfin le syndrome de Farndon (OMIM #155240), ou carcinome médullaire de la thyroïde familial (FMTC), que l'on retrouve dans 35% des cas de NEM2, a pour tableau clinique un CMT isolé, sans autre atteinte [116, 117].

Dans le cadre d'une NEM2, les PCC peuvent être symptomatiques ou asymptomatiques et parfois révélés par une mort subite au cours d'une anesthésie générale ou d'un accouchement par exemple. Ils sont rarement diagnostiqués avant l'âge de 20 ans et sont volontiers bilatéraux (2 cas sur 3) d'emblée au diagnostic ou au cours de l'évolution de la maladie [118].

Gène associé à la pathologie

Le gène responsable des NEM2 est un proto-oncogène, le gène *RET*, qui a été mis en évidence par Mulligan et ses collègues en 1993. Il comprend 21 exons codant pour un ARN messager de 60 kb, localisé en 10q11.2 [119]. Les mutations activatrices responsables des NEM2 sont retrouvées sur 7 exons de *RET* (les exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 et 16) qui sont analysés par séquençage pour le diagnostic génétique de la maladie [120].

Protéine codée par le gène *RET*

Le récepteur RET (RE-arranged during Transfection) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase (TK). Il est nécessaire au développement des cellules dérivées des crêtes neurales, du système nerveux périphérique et du système urogénital, à la surface desquelles il est exprimé. Il possède un large domaine extracellulaire, qui comporte un domaine riche en cystéines, ainsi que plusieurs domaines « cadherin-like ». La composante intracellulaire contient le domaine à activité tyrosine kinase phosphorylable, nécessaire à la transduction du signal. L'activation du récepteur nécessite deux étapes, la dimérisation par la formation d'un complexe protéique, et la phosphorylation du domaine TK. La dimérisation du récepteur est possible grâce au recrutement d'un ligand et d'un corécepteur : le GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor) et son récepteur le GFR α (GDNF family receptor α). Ce complexe est capable de se lier à deux récepteurs RET et d'induire leur dimérisation (Figure 10) [121].

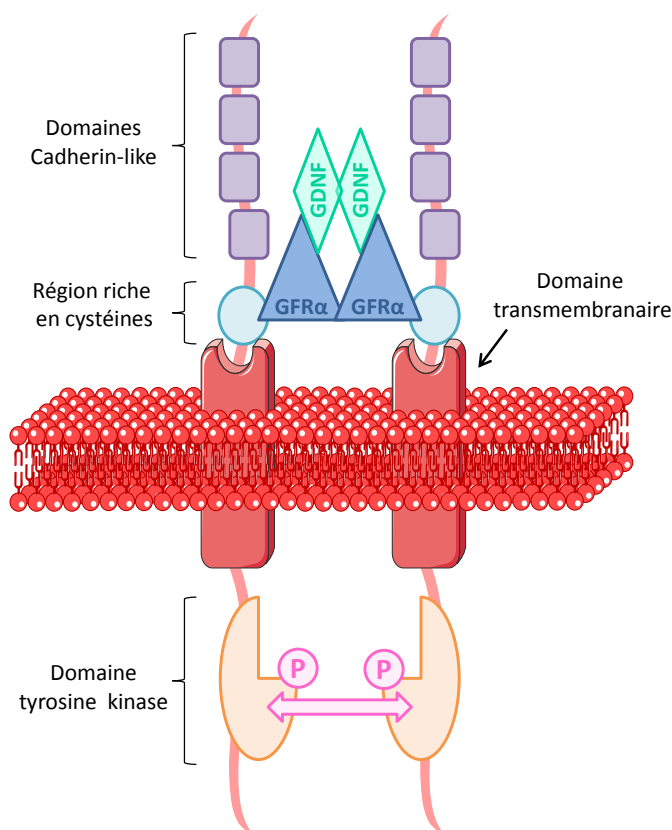


Figure 10 : Représentation schématique du récepteur RET, à activité tyrosine kinase

Adapté de Wagner, 2012 [121].

Cette dimérisation induit une autophosphorylation du récepteur et donc son activation. Quatorze à 18 résidus sont décrits comme phosphorylables ; parmi eux, on retrouve la Tyr⁹⁰⁰ et la Tyr⁹⁰⁵, dont la

phosphorylation induit une boucle d'activation, nécessaire à l'activation complète du récepteur. La Tyr¹⁰⁶² constitue un résidu clé, dont la phosphorylation est obligatoire pour l'activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT [122].

Les mutations faux-sens sont généralement associées à une activité constitutive du récepteur, en absence de ligand et de corécepteur [123]. Les mutations sur l'une des cystéines du domaine riche en cystéine induisent la rupture d'un pont disulfure et la libération d'une cystéine. Deux cystéines libres de récepteurs différents peuvent alors se lier et former un pont disulfure entre deux récepteurs mutés, mimant ainsi une dimérisation en absence de ligand et de corécepteur.

Les mutations siégeant sur les exons 10 et 11 sont notamment retrouvées dans les cas de NEM2A, tandis que les NEM2B sont généralement caractérisées par des mutations de l'exon 16 (en position 918 dans plus de 95% des cas) et plus rarement dans l'exon 15. Le FMTC est quant à lui généralement dû à des mutations dans les exons 10, 13 et 14 [124]. En revanche les mutations non-sens aboutissant à une perte de fonction sont associées à une toute autre pathologie : la maladie de Hirschsprung, responsable d'anomalies développementales [123].

c. *La maladie de von Hippel-Lindau*

Caractéristiques cliniques

La maladie de von Hippel-Lindau (OMIM #193300) qui doit son nom aux deux médecins qui ont participé à sa description (Eugen von Hippel, et Arvid Lindau), est un syndrome héréditaire, de transmission autosomique dominante [125]. Cette pathologie se caractérise par des tumeurs multiples du système nerveux central, de la rétine, des reins, du pancréas, des glandes surrénales, ou encore de l'épididyme ou du ligament large. Avec une incidence de 1/36 000 naissances, il s'agit d'une pathologie rare dont la pénétrance est de l'ordre de 90% à 65 ans [126]. En fonction du phénotype des patients (selon les organes atteints), 4 groupes ont été définis pour classer les patients atteints de la maladie de von Hippel-Lindau. Le type 1 dans lequel il n'y a pas de PCC/PGL et les types 2 où l'on retrouve des PCC/PGL. Ils sont associés à des hémangioblastomes du SNC et de la rétine dans le type 2A. Le type 2B est caractérisé par des atteintes de tous les organes cibles, tandis que dans le type 2C, on trouve exclusivement des PCC/PGL [127, 128].

L'une des manifestations les plus courantes de la pathologie est l'hémangioblastome du SNC, que l'on retrouve chez 60 à 80% des patients. Ces tumeurs généralement bénignes, se retrouvent le long de l'axe cranio-spinal, au niveau du cervelet, du tronc cérébral, de la moelle épinière ou des racines des nerfs lombo-sacrés. L'oreille interne peut également être atteinte (tumeurs du sac endolymphatique). Ces tumeurs sont bénignes mais peuvent entraîner des pertes auditives et des troubles de l'équilibre. On retrouve également fréquemment des hémangioblastomes rétiens (chez 60% des atteints). Les atteintes peuvent être multiples et souvent bilatérales. L'âge de survenue est en moyenne de 25 ans. Parmi les atteintes viscérales, on retrouve des carcinomes rénaux à cellules claires (RCC), volontiers bilatéraux, qui représentent la première cause de cancer rénal héréditaire. Dans 10 à 20% des cas, les patients vont développer des PCC/PGL, pouvant se présenter sous formes bilatérales et/ou multiples, généralement vers l'âge de 30 ans. Dans le cadre d'une maladie de type 2C, cette manifestation clinique est la seule de la pathologie. Les atteintes pancréatiques sont souvent kystiques et bénignes, bien que leur multiplicité puisse avoir un impact important au niveau digestif, en cas d'obstruction partielle ou totale du canal pancréatique. Des atteintes solides - tumeurs neuroendocrines-, sont également présentes, avec une incidence plus faible mais dont le

potentiel de malignité est important. Des cystadénomes sont également décrits, assez fréquemment au niveau de l'épididyme chez l'homme (25-60%) et très rarement au niveau du ligament large chez la femme. Ces tumeurs sont bénignes et le plus souvent asymptomatiques [129-131].

Gène associé à la pathologie

En 1993, Latif et al. publièrent la découverte du gène suppresseur de tumeurs responsable de la pathologie, mis en évidence par clonage positionnel : le gène *VHL*, localisé en 3p25.5 [132]. Ce gène code pour un ARN messager de 4,7kb, permettant la synthèse de deux polypeptides différents, de 213 ou de 180 aa [133]. La plupart des mutations perte de fonction du gène *VHL*, aujourd'hui facilement détectables par un test génétique sur de l'ADN leucocytaire, sont répertoriées (<http://www.umd.be/VHL/>). Il s'agit de mutations faux-sens ou non-sens, d'insertions, de micro-délétions, de délétions de petites ou de grandes tailles ou encore de mutations d'épissage, que l'on retrouve tout le long de la séquence génique [128]. Ces mutations sont autosomiques et transmissibles à la descendance. Cependant il est possible de voir émerger des néo-mutations ou des mutations à un stade précoce du développement donnant ainsi lieu à un mosaïcisme plus ou moins important selon le stade embryonnaire au cours duquel la mutation est apparue [126]. Par ailleurs, il a également été décrit, chez des patients sans histoire familiale de maladie de von Hippel-Lindau, des mutations somatiques du gène *VHL*, responsables du développement de PCC/PGL [101].

Protéines codées par le gène VHL

Le gène *VHL* code pour 3 transcrits, mais seuls deux d'entre eux codent pour des protéines : pVHL₃₀ (de localisation cytoplasmique et nucléaire) et pVHL₁₉ (exclusivement nucléaire). Les deux isoformes sont généralement étudiées simultanément, d'autant que la majorité des mutations décrites sur le gène *VHL* se retrouvent dans la région commune aux deux protéines [128, 133]. pVHL appartient à un complexe multi-protéique de type Culline/RING ubiquitine ligase. Celui-ci comprend une enzyme de type E3 ubiquitine ligase, la Culline 2, qui lorsqu'elle est activée est capable de recruter une protéine RING finger (Culline 2 recrutant toujours RBX1). pVHL qui forme un complexe avec les Elongines B et C est la sous unité du complexe capable de se fixer au substrat de l'ubiquitine ligase (Figure 11) [134].

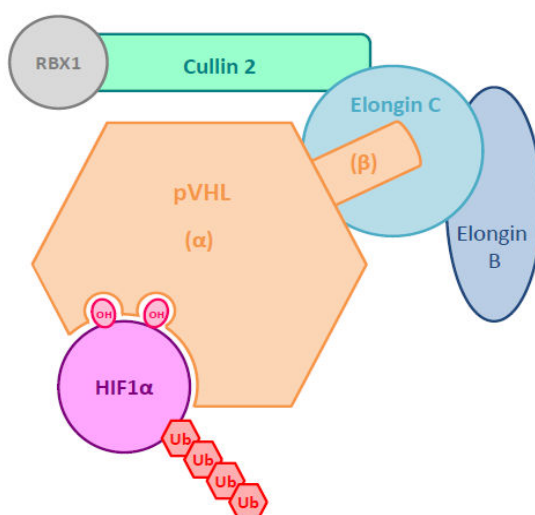


Figure 11 : Représentation schématique de la protéine pVHL dans le complexe Culline/RING finger.

pVHL est ici représentée en interaction avec son substrat le plus étudié HIF1α hydroxylé

OH : groupement hydroxyle, Ub : groupement ubiquitine

pVHL comporte deux domaines : le domaine α , qui permet la reconnaissance du substrat, et le domaine β notamment composé de 3 hélices α nécessaires à la liaison à l'Elongine C. Les cibles de pVHL sont des protéines destinées à être adressées au protéasome 26S. Parmi les différentes cibles, on retrouve la protéine kinase atypique $C\lambda$ (aPKC λ), les enzymes de désubiquitination interagissant avec pVHL (VDUs : VDU1 et VDU2), deux sous-unités de l'ARN polymérase de type II (Rbp1 et Rbp7), et la sous unité α du facteur 1 de réponse à l'hypoxie (HIF1 α). Il s'agit de la cible la plus connue et la mieux caractérisée, reconnue par pVHL lors qu'elle est hydroxylée [135].

Il a par ailleurs été suggéré que la protéine pVHL pouvait être impliquée dans la régulation du cytosquelette et de l'interaction cellule-matrice extracellulaire (MEC). pVHL serait en effet capable d'interagir avec les microtubules du cytosquelette [136], et des mutations du gène *VHL* induiraient une augmentation de métalloprotéases, par un défaut d'inhibiteurs de métalloprotéases. Enfin quelques études montrent que pVHL pourrait être un inhibiteur de la cycline D1, suggérant un rôle de pVHL dans le contrôle du cycle cellulaire et donc de la prolifération, de façon HIF-indépendante [137].

B. Les présentations non syndromiques

Dans certains cas, les phéochromocytomes et/ou paragangliomes constituent la seule manifestation d'une pathologie néanmoins héréditaire, on parle alors de formes non syndromiques.

a. Les PCC/PGL héréditaires SDHx-dépendants

Gènes associés à la pathologie

Dans les années 1990, des études de liaison ont été réalisées dans des familles où ségrégaient des paragangliomes et ont permis la mise en évidence des loci PGL1, localisé en 11q23 [138], PGL2, en 11q13 [138, 139] et PGL3, en 1q23 [140].

Chronologiquement, ce sont des mutations constitutionnelles de *SDHD* (PGL1), puis de *SDHC* (PGL3) et *SDHB* (*a posteriori* dénommé PGL4) qui ont été mises en évidence au début des années 2000. Plus récemment, en 2009 et 2010, des mutations des gènes *SDHAF2* (PGL2) et *SDHA* ont également été retrouvées chez des patients ayant développé un PCC et/ou un PGL. Les gènes *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHB* et *SDHD*, pas *SDHAF2*), codent pour les différentes sous-unités d'une même enzyme, la succinate déshydrogénase, et ont été successivement démontrés comme étant responsables du développement de phéochromocytomes et de paragangliomes. Les mutations identifiées sur les gènes *SDHx* sont répertoriées dans la base de données des mutations des gènes du cycle de l'acide citrique (TCA cycle gene mutation database, http://chromium.liacs.nl/lovd_sdh/) [141].

Le premier gène mis en évidence fut le gène *SDHD*, découvert en 2000 par Baysal et al. grâce à l'existence d'une mutation à effet fondateur en Hollande (p.Asp92Tyr) [142]. Les mutations sont transmises de façon autosomique dominante, avec une pénétrance quasiment complète lorsque la mutation est transmise par le père (87 à 100%). En effet, le gène étant soumis à empreinte génétique maternelle, une femme porteuse d'une mutation ne peut pas transmettre la maladie à ses enfants, quel que soit leur sexe. Ce gène de 400 kb, localisé en 11q23 comporte 4 exons codant pour une protéine de 160 aa. Les mutations du gène *SDHD*, qui représentent environ 5% des cas de PCC/PGL, sont préférentiellement associées à des paragangliomes de la tête et du cou, généralement bénins mais multifocaux. La malignité de ces tumeurs est assez faible, elle est estimée à environ 2,5% dans

la population porteuse de la mutation fondatrice hollandaise [143], et peut aller jusqu'à 4% dans d'autres cohortes [144].

La technique de « gènes candidats » a ensuite très vite permis à l'équipe de Niemann d'identifier des mutations sur le gène *SDHC*, également en 2000. Il s'agit de mutations relativement rares, que l'on retrouve dans un plus petit nombre de cas [145]. Les tumeurs associées sont majoritairement des PGL de la tête et du cou (carotidien, jugulaire, vagal, tympanique ou laryngé) au potentiel malin faible [21, 146], cependant des cas de PCC et PGL extra-surrénalien (abdominal) [147, 148], ainsi qu'un cas de PGL malin ont été décrits [149]. Localisé en 1q23.3, ce gène compte 6 exons, codant pour une protéine de 150 aa.

En 2001, Astuti et al. mettent à leur tour en évidence des mutations sur un nouveau gène *SDHx* chez des patients ayant développé un PCC et/ou un PGL apparemment sporadique. Ils identifient alors *SDHB* comme étant un nouveau gène de prédisposition au PCC/PGL [150]. Les mutations observées sur ce gène de 8 exons, localisé en 1p35-36, sont transmises selon un mode autosomique dominant. Elles ont cependant une pénétrance faible qui évolue avec l'âge : elle est d'environ 40% à 40 ans et augmente jusqu'à 70% à 60 ans [151]. Les mutations du gène *SDHB* sont préférentiellement associées à des tumeurs extra-surréaliennes de localisation abdominale, pelvienne ou thoracique. Cependant des paragangliomes de la tête et du cou peuvent être associés, notamment des paragangliomes carotidiens [152, 153]. Environ 20 à 40% des porteurs de mutations sur ce gène développent une forme maligne de leur maladie, ce qui représente entre 60 et 70% de l'ensemble des tumeurs malignes [154] (Voir Paragraphe II).

En 2009, Ha et al. mettent en évidence que *SDHAF2*, un petit gène de 4 exons (2003 pb codant pour une protéine de 166 aa) localisé en 11q13.1, est impliqué dans le développement de paragangliomes de la tête et du cou. En effet, ils retrouvent une même mutation (p.Gly78Arg) dans 3 familles hollandaises. La protéine codée par ce gène, est en interaction directe avec SDHA, en étant responsable de la flavination de cette dernière [155]. Cette mutation située dans l'exon 2 dans la région la plus conservée de la protéine, a également été retrouvée dans une famille espagnole, et est responsable de la diminution de la stabilité du complexe protéique. Sa transmission est autosomique dominante à pénétrance incomplète. Comme le gène *SDHD*, ce gène est soumis à empreinte maternelle [156].

Déjà connues pour être responsables du syndrome de Leigh, une encéphalopathie juvénile [157] (pathologie neurodégénérative récessive causant épilepsie, retard psychomoteur et tétraspasticité), les mutations du gène *SDHA* ont été identifiées en 2010 par mon équipe d'accueil comme impliquées dans le développement de PCC et de PGL [158]. Localisé en 5p15, ce gène de 15 exons présente de très nombreux variants alléliques, fréquents dans la population générale. En revanche, probablement à cause du faible taux de pertes chromosomiques à ce locus, les pertes d'expression des deux allèles sont rares.

Depuis la mise en évidence de leur implication dans le développement de PCC et de PGL, des mutations des gènes *SDHx* ont été décrites dans d'autres types de cancers.

La « diade de Carney-Stratakis » est un syndrome héréditaire de transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète (OMIM 606864), qui prédispose au développement de GIST multifocaux et de PGL multiples. La grande majorité des GIST présentent des mutations somatiques

activatrices des gènes *KIT* ou *PDGFRA*, avec néanmoins quelques cas publiés avec mutations constitutionnelles [159, 160]. Plusieurs groupes ont d'abord rapporté des mutations des gènes *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* dans des cas de diade de Carney-Stratakis [161-163]. L'étude de Janeway a ensuite montré que des mutations *SDHx* pouvaient être retrouvées chez des patients ayant développé uniquement un GIST [164]. Des études récentes, incluant le gène *SDHA* parmi les gènes étudiés ont permis de montrer que parmi les GIST non-mutés pour *KIT* ou *PDGFRA*, environ 10% seraient porteurs de mutation du gène *SDHA*. *SDHA* serait donc le gène *SDHx* le plus fréquemment muté dans ce contexte particulier (ces mutations pouvant être dépistées par immunohistochimie car, comme pour les PCC/PGL, les GIST *SDHA* mutés présentent un immunomarquage négatif pour *SDHB* et pour *SDHA*) [165-167].

En 2004, Neumann et al. rapportent pour la première fois des patients porteurs de mutations constitutionnelles sur le gène *SDHB*, ayant développé des PCC et ou des PGL ainsi que des cancers rénaux à cellules claires, pour lesquels la mutation *SDHB* était associée à une LOH dans la tumeur rénale [168]. Depuis cette étude, d'autres groupes ont décrit des cas de cancers rénaux dans un contexte de mutations du gène *SDHB*, associés [169] ou non à des PCC/PGL [170]. Finalement l'étude d'une large cohorte de patients *SDHB*-mutés a permis d'évaluer à 3,7% (11/295) le risque de développer une tumeur rénale [151]. Quelques cas de RCC ont également été rapportés chez des patients porteurs de mutations des gènes *SDHC* ou *SDHD*, présentant également des PCC ou des PGL [171, 172].

Des études portant sur des cas isolés ont suggéré l'implication des gènes *SDHx* dans le développement d'adénomes pituitaires, de carcinomes thyroïdiens, de séminomes testiculaires, de tumeurs gastriques, de neuroblastomes ou encore d'hyperplasies médullo-surrénaliennes bilatérales. Cependant, dans la majorité des cas, la preuve définitive de la fonctionnalité des mutations n'a pas été apportée (cf. Table 10).

Type de cancer	Gène	Cas	Description	Référence
Adénome pituitaire	<i>SDHA</i>	1	Adénome pituitaire + PGL	[173]
	<i>SDHC</i>	1	Macro-adénome pituitaire PGL foramen jugulaire	[174]
	<i>SDHD</i>	1	Tumeur pituitaire + PCC+ PGL	[175]
Carcinome papillaire thyroïdien (CPT)	<i>SDHD</i>	1	CPT	[168]
	<i>SDHC</i>	1	Néoplasies multiples CPT + PGLs Mutation du gène <i>PTEN</i>	[176]
Séminome testiculaire	<i>SDHD</i>	1	Séminome testiculaire LOH au locus <i>SDHD</i>	[177]
Tumeur gastrique	<i>SDHB</i>	1	Mutation somatique, Tumeur gastrique Pas de perte d'expression protéique	[178]
Neuroblastome	<i>SDHB</i>	3	1) délétion exon 1, neuroblastome, pas d'autre atteinte, PGL malin chez son frère, 2) délétion complète, tumeur composite : PGL et neuroblastome 3) mutation ponctuelle déjà rapportée c.418G>T, neuroblastome, PGL extra-surrénalien malin, RCC	[152, 179, 180]
Hyperplasie médullo-surrénalienn	<i>SDHB</i>	1	Hyperplasie bilatérale (ratio cortex/médulla 1:1) Antécédents familiaux PCC <i>SDHB</i> -malins	[181]

Table 10 : Récapitulatif des néoplasies rares *SDHx*-dépendantes

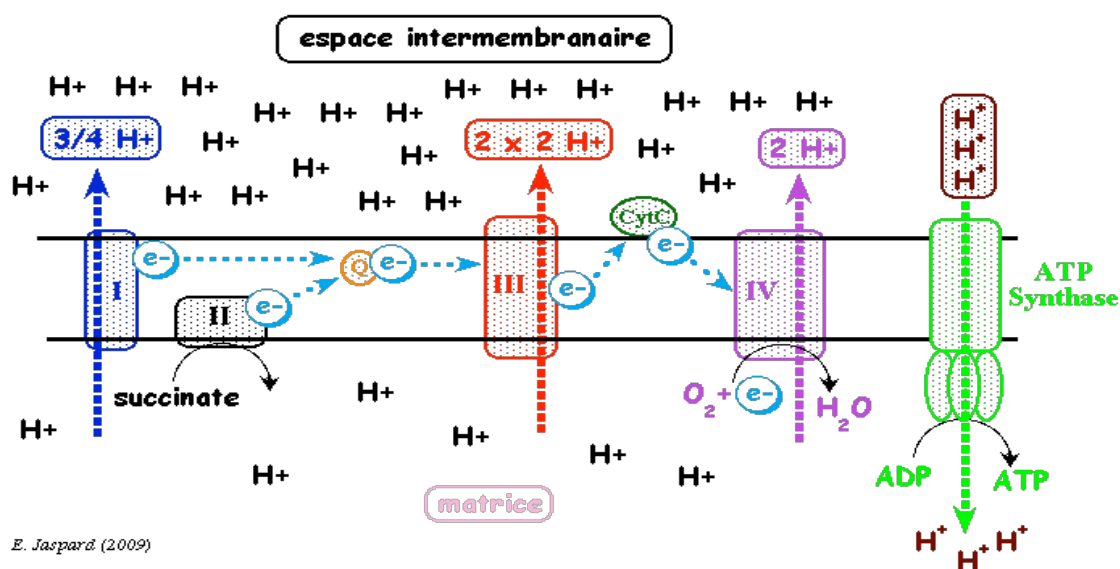
Ainsi, l'absence d'analyse complémentaire systématique de ces tumeurs (anatomo-pathologiques et présence de LOH par exemple) ne permet pas toujours de conclure de façon certaine sur l'association des mutations *SDHx* et des néoplasies décrites. C'est notamment le cas pour les carcinomes

thyroïdiens, qui peuvent être des paragangliomes thyroïdiens mal identifiés, du fait de leur rareté [182].

Bien que trois cas aient été décrits, les études d'Astuti et al. et de Grau et al. portant respectivement sur l'analyse de 46 et 28 patients avec neuroblastome, n'ont pas permis de confirmer l'implication du gène *SDHB* dans ces tumeurs [183, 184].

Protéines codées par les gènes *SDHx*

Les gènes *SDHx* codent pour les quatre sous-unités d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase (SDH), ou succinate coenzyme Q réductase (SQR) qui constitue le complexe II de la chaîne respiratoire [185] où elle assure le transport des électrons issus de l'oxydation des substrats carbonés du cycle de Krebs vers le coenzyme Q (Figure 12).



E. Jaspard (2009)

Figure 12 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les flèches en pointillés représentent le sens du transfert des électrons ou des protons

e^- : électron, Q : coenzyme Q, CytC : cytochrome c, H^+ : proton

Elle participe également au cycle de Krebs (Figure 13) où elle catalyse l'oxydation du succinate en fumarate.

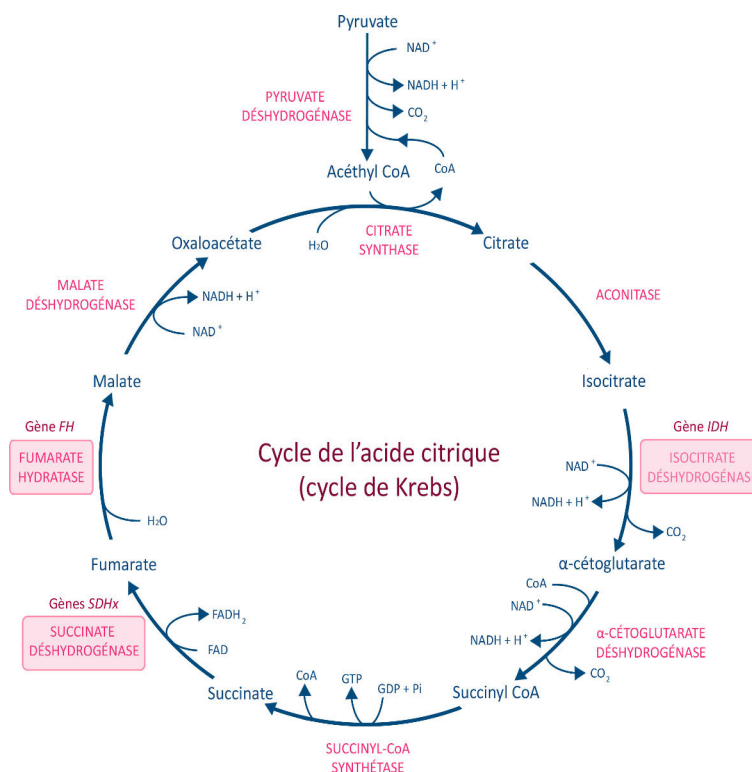


Figure 13 : Cycle de Krebs - cycle de l'acide citrique

La SDH est ancrée à la membrane mitochondriale interne *via* ses deux sous-unités d'ancrage (SDHC et SDHD), qui constituent le domaine lipophile de l'enzyme. Les sous-unités SDHA et SDHB sont les sous-unités catalytiques formant le domaine hydrophile de l'enzyme situé dans la matrice mitochondriale (Figure 14).

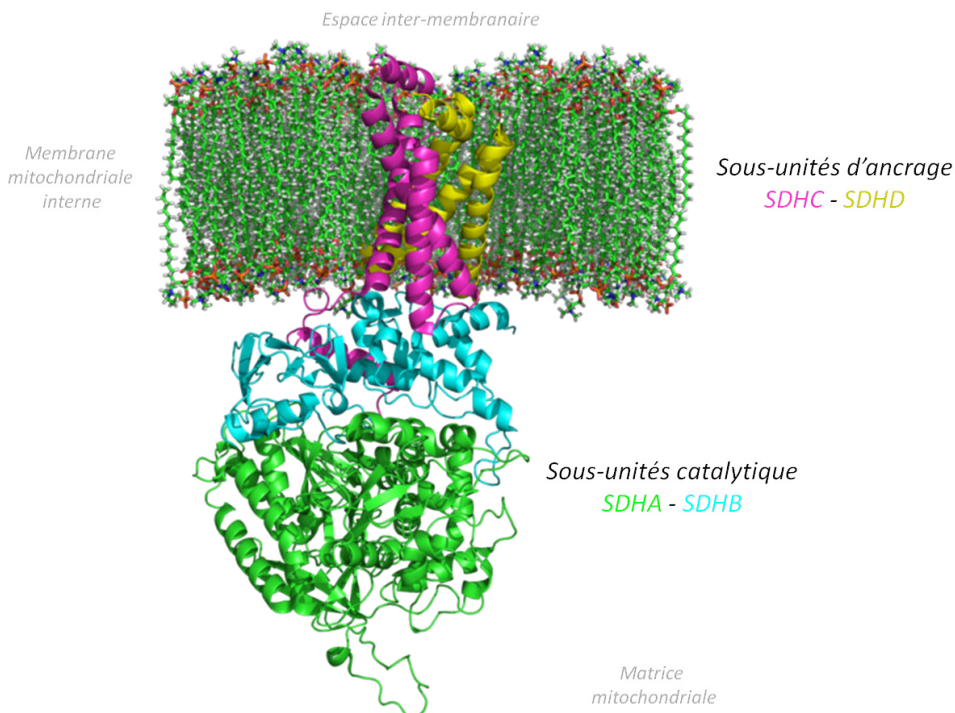


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la succinate déshydrogénase

La sous-unité SDHA est capable de lier de façon covalente le FAD (flavine adénine dinucléotide), tandis que la sous-unité SDHB comporte 3 centres Fe-S permettant le transfert des électrons. La régulation de l'activité enzymatique se fait par le biais de modifications post-traductionnelles : par phosphorylation et par acétylation réversibles des sous-unités catalytiques. Ces modifications sont associées à une diminution de l'activité enzymatique, tout comme la présence d'inhibiteurs compétitifs (comme l'oxaloacétate), qui vont eux agir directement au niveau du site actif.

L'assemblage des différents complexes est mal compris, et requiert de très nombreux cofacteurs, notamment pour les complexes I, III, IV et V. Les protéines d'assemblage du complexe II connues sont moins nombreuses, puisque seules 4 sont décrites : Tcm62, qui aurait un rôle de stabilisateur des protéines mitochondriales en réponse au stress, mais sans effet sur les autres complexes de la chaîne. FLX1 est décrit comme nécessaire au recrutement du FAD par la protéine SDHA. Enfin SDHAF1 et SDHAF2 sont deux protéines solubles dans la matrice extracellulaire, capables d'interagir avec la SDH et dont l'absence a pour conséquence une instabilité du complexe [186]. La SDH comporte quelques particularités comparativement aux autres complexes de la chaîne respiratoire. C'est la seule enzyme mitochondriale dont toutes les sous-unités sont codées par des gènes nucléaires et qui ne participe pas au transfert de protons vers l'espace inter-membranaire.

b. Les PCC/PGL héréditaires FH-dépendant

Gène associé à la pathologie

Décrite pour la première fois en 1986 par Zinn et ses collaborateurs, la déficience en FH est une encéphalopathie sévère qui associe retards mentaux et malformations cérébrales [187]. C'est en 1994 que Bourgeron et al. mettent en évidence des mutations homozygotes du gène *FH* (8 exons, localisé en 1q42.1) comme étant responsables de cette pathologie [188].

En 2002, le groupe de Tomlinson identifie le gène *FH* comme responsable du développement de léiomyomes multiples cutanés et utérins (MCUL, multiple cutaneous and uterin leiomyomata, OMIM #150800). Dans certaines familles, ces tumeurs bénignes de la peau (et de l'utérus chez la femme) sont retrouvées en association avec des cancers du rein, dans un syndrome de prédisposition héréditaire appelé HLRCC (hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer, OMIM #605839) [189]. Les mutations constitutionnelles hétérozygotes prédisposent aux MCUL et aux HLRCC et sont associées à une LOH dans la tumeur, faisant du gène *FH* un GST [190].

Il a par ailleurs été décrit des cas de patients porteurs de mutations constitutionnelles du gène *FH* ayant développé des léiomyomes atypiques (4 cas), des tumeurs mammaires (4 cas), ainsi qu'un cas de tumeur de la vessie. Tous présentaient une LOH au locus *FH* [191]. Un cas de tumeur des cellules de Leydig a également été rapporté [192].

Le gène *FH* a été ajouté à la liste de gènes responsables du développement de PCC/PGL en 2013. Le séquençage de l'exome d'un patient « pseudo-SDH » (tumeur classée avec les tumeurs *SDHx* après classification transcriptomique non-supervisée mais ne présentant pas de mutation sur l'un des gènes *SDHx*) a en effet permis à mon équipe de mettre en évidence une mutation constitutionnelle sur le gène *FH*, associée à une mutation somatique au niveau tumoral [193]. Dans une étude bi-centrique réalisée sur 598 patients en collaboration avec l'équipe de M. Robledo (CNIO, Madrid), ils ont ensuite montré que le gène *FH* est responsable d'environ 1% des cas de PCC/PGL. Les mutations décrites sont de types faux-sens, localisées dans les exons 3, 5, 7 et 8 ou des mutations d'épissage

[194]. Les mutations du gène *FH* seraient par ailleurs préférentiellement retrouvées chez des patients ayant développé des formes multiples ou métastatiques de leur maladie, ce qui suggère que ce gène prédispose aux PCC/PGL malins.

Protéine codée par le gène FH

Le gène *FH* code pour deux ARN messagers, un précurseur (ou forme longue) et une forme courte, codant respectivement pour deux « echoprotéines » de la fumarate hydratase (des protéines identiques, pourvues des mêmes fonctions, mais ayant des localisations différentes). L'ARNm précurseur qui contient un signal d'adressage mitochondrial (MTS : mitochondrial targeting signal), code pour une forme mitochondriale, tandis que l'ARNm court (dépourvu de MTS) code pour une forme cytosolique de l'enzyme [195].

La fumarate hydratase (FH) s'associe en homo-tétramère et est responsable de la conversion stéréospécifique et réversible du fumarate en malate [192]. Cette réaction enzymatique a principalement lieu dans les mitochondries au sein du cycle de Krebs. Il a cependant été montré que l'activité enzymatique de la FH pouvait être impliquée dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. L'inactivation de FH semble entraîner un défaut de phosphorylation de H2AX et CHK2, ainsi qu'une absence d'arrêt du cycle cellulaire successif à ce dommage à l'ADN. Ceci suggère un rôle du fumarate dans ce processus (dont la supplémentation permet de modérer le phénotype), et un transport nécessaire de la FH cytosolique vers le noyau [195].

Par ailleurs des travaux récemment publiés montrent que la réexpression de la forme cytosolique de la FH est suffisante pour améliorer le phénotype rénal observé chez des souris porteuses d'une inactivation du gène *Fh* dans les tubules rénaux (micro- et macro-kystes hyperplasiques). Les auteurs observent en effet une restauration des niveaux de fumarate intracellulaires, ainsi que des métabolites du cycle de l'urée et de la biosynthèse de l'arginine, fortement dérégulés par l'absence de FH dans les reins de ces souris [196].

Au-delà de son rôle dans le cycle de l'acide carboxylique, la FH serait donc également impliquée dans la régulation du cycle de l'urée et de la biosynthèse de l'arginine. Son substrat, le fumarate, aurait quant à lui un rôle (encore mal défini) dans les processus de réparation des cassures doubles brins de l'ADN.

c. Les phéochromocytomes familiaux

Gènes associés à la pathologie

Dans le cadre de présentations non syndromiques, deux autres gènes ont été mis en évidence, comme étant responsables du développement de phéochromocytomes.

En 2010, le gène *TMEM127* est identifié comme étant un nouveau GST. Des mutations sont retrouvées au niveau constitutionnel associées à une LOH au locus 2q11. Les patients porteurs de mutations *TMEM127* développent des PCC, dans la moitié des cas bilatéraux, le plus souvent bénins [197]. La transmission des mutations se fait selon le mode autosomique dominant, avec une pénétrance incomplète. Les mutations du gène *TMEM127* permettent d'expliquer environ 1% des cas de PCC [198].

En 2011, grâce à la technique d'« exome sequencing », le gène *MAX* a pu être ajouté à la liste des gènes de prédisposition aux PCC. Les mutations sont associées à une LOH dans les tumeurs qui se

développent chez des patients statistiquement plus jeunes que les cas sporadiques [199]. Les mutations *MAX* sont retrouvées chez environ 1% des patients atteints de PCC/PGL. Environ 15% des patients porteurs de mutations sur ce gène développent aussi des PGL [200].

Protéines codées par les gènes TMEM127 et MAX

La Transmembrane protein 127 codée par le gène *TMEM127* comporte, comme son nom l'indique, 3 domaines transmembranaires très conservés, mais aucun motif fonctionnel connu [197]. Des études d'extinction génique de *TMEM127* dans des modèles cellulaires ont permis de révéler son rôle dans la régulation de la voie mTOR, son inactivation conduisant à la phosphorylation des cibles de mTORC1. Une étude récente, qui montre par ailleurs l'implication de *TMEM127* dans le développement de RCC, a suggéré un rôle de *TMEM127* dans la fusion RAB5-dépendante des endosomes précoces et tardifs, et donc dans la régulation du trafic intracellulaire de protéines. En l'absence de la protéine codée par *TMEM127*, mTORC1 ne serait plus associée à RAB5, et serait disponible pour interagir avec son complexe protéique d'activation et pour induire une cascade de signalisation impliquée dans la prolifération et la survie des cellules, ainsi que dans le métabolisme et la différenciation cellulaire [201, 202].

La protéine MAX (MYC-associated protein X) est une protéine ubiquitaire, jouant un rôle central dans le contrôle de la dimérisation de l'axe MYC/MAX/MAD. Lorsque MAX interagit avec MYC, le complexe protéique est alors capable d'agir comme facteur de transcription, et d'activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose, et la transformation cellulaire, *via* la reconnaissance d'Ebox, dans les séquences promotrices des gènes. Les hétérodimères MAX/protéines de la famille MXD1 (MXD1, MXI1, MXD3 ou MXD4) sont quant à eux associés à la répression de ces gènes, également *via* les Ebox. L'association MAX/MNT est impliquée dans la répression de la transformation cellulaire dépendante de MYC, tandis que l'interaction de MAX avec MGA (Max-gene associated protein) est responsable de l'inhibition des gènes induits par MYC [203]. Par ailleurs, le gène *MAX* est inactivé dans les cellules PC12 [199] (modèle cellulaire, largement utilisé dans les laboratoires, dérivé d'un phéochromocytome de rat, *cf.* Section Résultats et discussions, Paragraphe III. 1. 1).

C. Les mutations exceptionnelles

a. *KIF1Bβ*

Le gène *KIF1Bβ*, codant pour une protéine de la superfamille des kinésines, est localisé en 1p36, locus fréquemment perdu dans les cancers dérivés des crêtes neurales. En 2008, l'équipe de Kaelin met en évidence deux mutations (dont une mutation constitutionnelle) sur ce gène chez deux patients ayant respectivement développé un PCC associé à un neuroblastome et à un ganglioneurome, et un PCC seul [204].

Toujours en 2008, Yeh et ses collaborateurs, ont démontré que la mutation décrite chez le patient ayant développé un PCC et un neuroblastome ségrégait dans la famille de ce patient. Parmi les deux autres atteints (2/5 membres issus de 3 générations), un cas de PCC bilatéral a été rapporté, ainsi qu'un cas d'adénocarcinome pulmonaire. Ceci suggère que les mutations du gène *KIF1Bβ* soient également présentes dans des tumeurs d'origine embryonnaire différente des crêtes neurales. Ces tumeurs sont transcriptionnellement plus proches des tumeurs *RET* ou *NF1*, mais ces cas semblent être excessivement rares [205]. De façon très récente, deux nouveaux cas, porteurs de mutation de

KIF1B ont été identifiés par NGS (« Next Generation Sequencing », séquençage nouvelle génération) : une mutation constitutionnelle chez un patient porteur d'un PCC et d'un carcinome de l'endomètre, ainsi qu'une mutation somatique chez un patient ayant par ailleurs une mutation constitutionnelle du gène *NF1* [206].

b. *PHD2*

Les mutations constitutionnelles du gène *PHD2*, codant pour la prolyl-hydroxylase de type 2 (ou protéine EGLN1), sont généralement connues pour être responsables d'une polyglobulie familiale. En 2008, Ladroue et al. ont rapporté le cas d'un patient présentant un paragangliome et une polyglobulie et une mutation constitutionnelle de *PHD2*. La mutation était présente à l'état hétérozygote dans l'ADN germlinal et associée à une perte d'hétérozygotie au niveau tumoral suggérant que *PHD2* est un GST [207]. Depuis, une autre mutation constitutionnelle de *PHD2* a été identifiée dans un contexte de PCC, sans que les analyses bio-informatiques n'aient pu confirmer la pathogénicité du variant mis en évidence [206].

c. *IDH1*

En 2008, une étude de génomique intégrée réalisée sur 22 échantillons de glioblastomes multiformes (GBM) a permis à Parsons et al. d'identifier un nouveau gène codant pour une enzyme du cycle de Krebs, comme responsable du développement de tumeurs. Des mutations somatiques du gène *IDH1*, codant pour la forme cytoplasmique de l'isocitrate déshydrogénase sont en effet retrouvées dans des gliomes de grades II-III et dans des GBM secondaires [208]. L'importance de cette découverte est confirmée en 2009 par Yan et ses collaborateurs dans une large cohorte de 445 tumeurs du système nerveux central, où ils identifient un très grand nombre de mutations somatiques des gènes *IDH1* et *IDH2* (codant respectivement pour les formes cytoplasmiques et mitochondriales de l'isocitrate déshydrogénase), dans 70% des cas d'astrocytomes, d'oligodendrogliomes et d'épendymomes. Ces mutations récurrentes sont retrouvées sur une arginine (codon 132 d'*IDH1*, et codon 172 d'*IDH2*) du site de liaison de l'enzyme avec son substrat, l'isocitrate [209].

Par la suite, ces mêmes mutations ont été mises en évidence dans le développement de leucémies myéloïdes aiguës [210], de tumeurs cartilagineuses (chondrosarcomes centraux et périostiques) [211], de cholangiocarcinomes intra-hépatiques (tumeurs du canal biliaire) et d'adénocarcinomes colorectaux [212].

Des mutations somatiques n'affectant pas ces codons spécifiques ont également été retrouvées dans des cas de cancers thyroïdiens folliculaires et anaplasiques, dans des codons également très conservés au cours de l'évolution, et potentiellement impliqués dans la liaison du substrat à l'enzyme [213].

La quasi absence de mutations autres que des substitutions affectant les arginines 132 ou 172, couplée à une absence de perte de l'allèle sauvage (pas de LOH) avait suggéré l'existence d'un effet dominant négatif des enzymes mutées sur les enzymes normales. L'étude de Dang et al. a cependant démontré dans un modèle cellulaire puis dans des échantillons tumoraux, que les atteintes du codon 132 de l'*IDH1* avaient pour conséquence une activité néomorphique de l'enzyme. Les enzymes mutées, devenues très affines pour le NADPH, mais ayant perdu leur affinité pour l'isocitrate sont capables de produire du 2-hydroxyglutarate (2-HG) à partir de l' α -kétooglutarate (α -KG) et une accumulation de ce métabolite est en effet retrouvée dans les tumeurs des patients porteurs de

mutations *IDH1* [214]. Des résultats similaires ont également été retrouvés dans des échantillons de patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës et porteurs de mutations sur le gène *IDH2* [215].

De par leur fonction cellulaire très proche des gènes codant pour la SDH, ces deux gènes ont été étudiés dans une cohorte de 365 PCC/PGL où une seule mutation somatique d'*IDH1* a pu être identifiée [216].

d. Bilan

Les gènes *KIF1Bβ*, *PHD2* et *IDH1* sont mutés de manière exceptionnelle dans des cas de PCC et/ou de PGL. Au total seuls 6 cas ont été décrits (cf. Table 11). Ces gènes comptent donc parmi les gènes minoritaires de prédisposition à la maladie.

Gène décrit	Mutation	Cas	Autres atteintes	Référence
<i>KIF1Bβ</i>	Ser1481Asn	1	Neuroblastome, ganglioneurome, léiomyosarcome du mésosigmoïde	[204-206]
	Glu1628Lys	1	Antécédent familial de PCC bilatéral	
	Tyr835Cys	1	-	
	-	1	Mutation germinale, carcinome de l'endomètre	
<i>PHD2</i>	-	1	Mutation somatique, NF1	[207] [206] [216]
	His374Arg	1	Polyglobulie, récurrence de PGL, mutation du gène <i>HFE</i>	
	Glu267Lys	1	-	
<i>IDH1</i>	Arg132Cys	1	-	

Table 11 : Récapitulatif des mutations retrouvées sur les gènes minoritaires impliqués dans la tumorigenèse des PCC/PGL.

D. Cas des mutations *HIF2A*

Des mutations sur les gènes *VHL*, *PHDs* ou *SDHx* ont été décrites chez des patients atteints de PCC et/ou de PGL. Elles conduisent toutes à la stabilisation anormale de la sous unité α des facteurs de réponse à l'hypoxie (HIFs) en conditions normoxiques mais jusqu'en 2012 aucune mutation n'affectant les gènes codant les HIFs n'avaient été mise en évidence.

Zhuang et al. ont rapporté, chez deux patients atteints de PCC/PGL et/ou de somatostatinoïdes, associés à une polyglobulie, des mutations somatiques sur le gène *HIF2A*. Ces mutations « gain de fonction » inhibent l'hydroxylation de la protéine, empêchant sa reconnaissance par la protéine pVHL, son ubiquitination et ainsi sa dégradation par le protéasome. Ces mutations ont par ailleurs pour effet d'augmenter la demi-vie de la protéine [217]. Des mutations somatiques de *HIF2A* ont été également retrouvées dans des séries indépendantes de patients [206, 218, 219]. Mon équipe d'accueil a montré en 2013, que les mutations somatiques de *HIF2A* pouvaient constituer un événement mutationnel *de novo* post-zygotique, et ainsi être présentes à l'état de mosaïque germinale [220]. A ce jour 25 cas de PCC/PGL pour lesquels une mutation du gène *HIF2A* a été mise en évidence ont été décrits.

E. Cas des mutations *H-RAS*

Très récemment, l'étude de Crona et al. a mis en évidence des mutations somatiques du gène *H-RAS* dans des cas de PCC et de PGL. Ce sont au total 4 mutations retrouvées chez des patients avec PCC/PGL sporadiques qui ont été décrites, dans les exons où siègent les « hot spots » mutationnels du gène. Le gène *H-RAS*, est l'un des trois membres de la famille RAS (*H-RAS*, *K-RAS* et *N-RAS*), codant pour des petites protéines à activité GTPase. Ces mutations activatrices induisent un défaut d'hydrolyse du GTP, et ainsi une activation de la voie de signalisation en aval, à savoir les voies

RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR, responsables de la prolifération et de la survie cellulaire. La fonctionnalité de ces mutations a d'ailleurs été confirmée par l'induction des protéines ERK et P-ERK, par immunohistochimie et par western blot dans les échantillons tumoraux [221].

Une seconde étude, réalisée sur une large cohorte de 271 échantillons a permis de confirmer l'importance des mutations somatiques H-RAS dans les PCC/PGL, avec près de 5% de mutations décrites. Cette seconde étude confirme par ailleurs le statut quasi-exclusivement bénin des tumeurs mutées, la présence majoritaire de ces mutations dans des cas de PCC, et l'absence de mutation sur les autres gènes RAS [222].

F. Test génétique

Ainsi, la mise en évidence de nombreux gènes de prédisposition et les études de cohortes ont montré qu'environ 40% des patients porteurs d'un PCC/PGL sont en fait porteurs d'une mutation constitutionnelle. La connaissance du statut génétique des patients est donc indispensable pour orienter leur prise en charge afin d'assurer un suivi adapté au risque génétique, d'évaluer les risques de malignité, et de proposer un dépistage familial génétique aux apparentés des sujets porteurs d'une mutation [223].

Certaines caractéristiques cliniques permettent de suspecter une maladie héréditaire : l'âge précoce au diagnostic, les tumeurs multiples ou bilatérales, les tumeurs extra-surréaliennes, les tumeurs malignes, les autres atteintes entrant dans un cadre syndromique et une histoire familiale de PCC/PGL. Le phénotype sécrétoire et les caractéristiques immunohistologiques de la tumeur permettent aussi d'orienter le génotypage [223].

L'immunohistochimie sur coupes de tissus fixés et inclus en paraffine s'est révélée être un outil performant pour orienter le génotypage. L'immunomarquage SDHB permet avec une très bonne sensibilité et une excellente spécificité de dépister une mutation sur l'un des gènes *SDHx*. Le marquage SDHB est en effet positif dans les cellules tumorales non mutées pour un gène *SDHx*, alors qu'il est négatif sur les coupes de tumeurs porteuses de mutations sur l'un des gènes *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*) [224]. L'immunohistochimie SDHA est par contre négative uniquement sur les coupes de tumeurs de patients porteurs de mutations sur le gène *SDHA* [225]. L'immunohistochimie MAX dépiste les mutations tronquantes du gène *MAX* par une absence d'immunomarquage dans les cellules tumorales, mais, en revanche, le marquage reste positif dans les cellules stromales et dans la tumeur en cas de mutations faux sens [200].

Enfin, le fumarate en excès présent dans les tumeurs porteuses de mutations sur le gène *FH*, permet d'identifier ces tumeurs par immunohistochimie. Celui-ci réagit de manière spontanée avec les groupements sulfhydryl des cystéines, conduisant à une modification stable des protéines : la succinylation, détectable avec un anticorps anti 2-SC (2-succino-cystéine). Les tumeurs porteuses de mutations sur le gène *FH* présentent ainsi un marquage 2-SC positif [194].

Un arbre décisionnel basé sur la présentation clinico-biologique et les études somatiques immunohistochimiques a été développé et est utilisé en routine pour prioriser les tests génétiques à effectuer chez les patients (Figure 15) [226, 227].

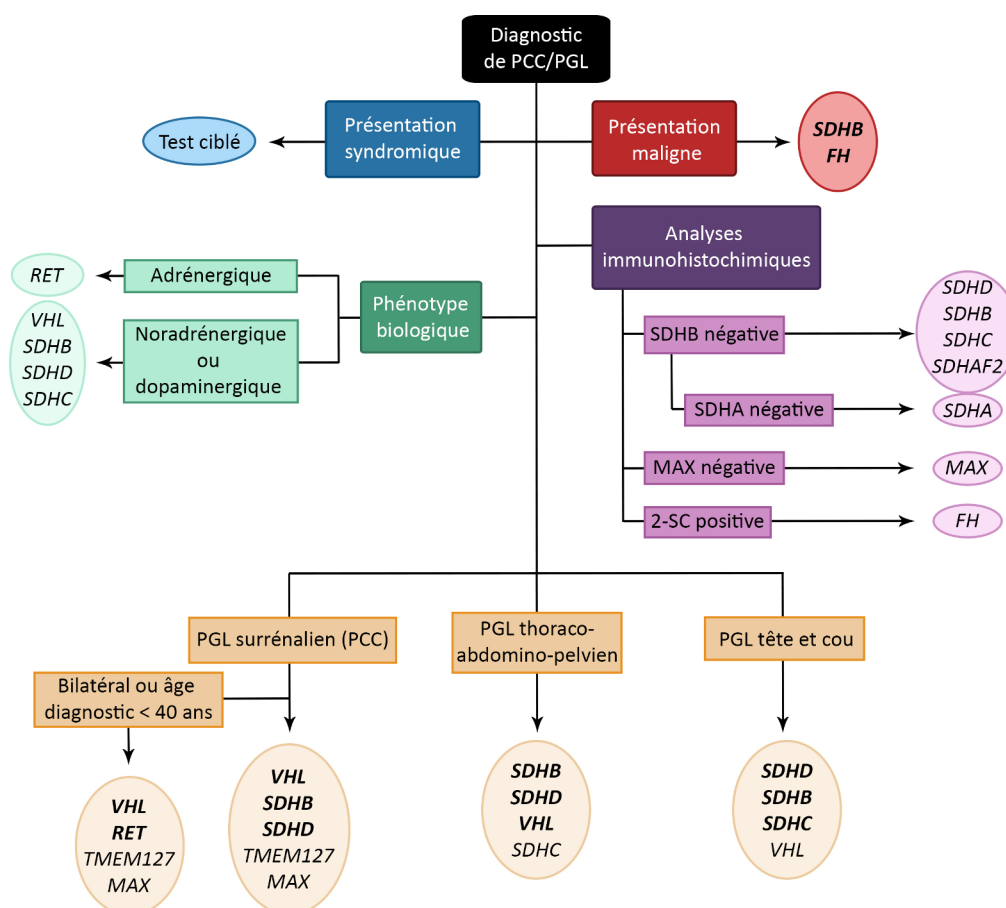


Figure 15 : Arbre décisionnel pour l'orientation de la recherche de mutations en fonction des caractéristiques cliniques et para cliniques

PCC : Phéochromocytome, PGL : paragangliome, 2-SC : 2-succino-cystéine. D'après Favier et al., 2012 [228].

8. Tumorigenèse des PCC/PGL

Quatre études indépendantes, réalisées sur respectivement 188, 76, 39 et 47 échantillons tumoraux (sporadiques et génétiquement déterminés) ont mis en évidence que la signature transcriptionnelle des PCC/PGL était dépendante de leur statut génétique. La classification non-supervisée des données transcriptomiques de ces tumeurs permet en effet de les regrouper par génotype [101, 229-231].

Ainsi, les PCC/PGL peuvent être divisés en deux sous-types:

- le cluster 1, regroupant les tumeurs porteuses de mutations sur les gènes *SDHx*, *FH* et *VHL*, caractérisées par une angiogenèse importante et une activation constitutive de l'hypoxie appelée « pseudo-hypoxie ». au sein du cluster 1, deux sous-groupe ont été identifiés, permettant de différencier les tumeurs *SDHx* et *FH* (cluster C1A) des tumeurs *VHL* (cluster C1B), qui présentent respectivement une induction de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, le métabolisme énergétique et l'adhésion cellulaire, ainsi que l'induction de la glycolyse.
- le cluster 2 qui comprend les tumeurs porteuses de mutations sur les gènes *RET*, *NF1*, *MAX* et *TMEM127*, ainsi que la majorité des tumeurs sporadiques, caractérisées par une activation des voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR. Les tumeurs génétiquement déterminées du

cluster 2 sont par ailleurs caractérisées par une surexpression des gènes associés à la différenciation neuroendocrine (comparativement aux tumeurs *SDHx* et *VHL*) [101].

Ces différences moléculaires sont le reflet de voies de tumorigenèse distinctes mises en place dans ces tumeurs : la « pseudo-hypoxie » et la voie de la prolifération et de la survie cellulaire. Ce sont notamment sur ces bases moléculaires que sont aujourd'hui envisagées de nouvelles thérapies dites « ciblées » (cf. ci-après).

A. La pseudo-hypoxie

Les cellules sont capables de répondre et de s'adapter à des variations de pression d'oxygène (pO_2), grâce aux HIF. Exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules, les HIFs agissent comme facteurs de transcription sous la forme d'un hétérodimère entre une sous-unité α et une sous-unité β . La régulation s'effectue au niveau de la sous-unité α , dont la demi-vie est inférieure à 5 minutes. En conditions normoxiques, les HIFs sont hydroxylés sur deux prolines (résidus très conservés au cours de l'évolution) par des prolyl-hydroxylases (PHD 1, 2 ou 3), dioxygénases dépendantes du fer et du 2-oxoglutarate qui utilisent l'oxygène comme substrat. La modification post-transcriptionnelle des HIFs induite par ces enzymes (hydroxylation des prolines 402 et 564) permet leur reconnaissance par la protéine pVHL, leur ubiquitination, et leur adressage au protéasome p26 pour dégradation (Figure 16A). L'acétylation de la lysine 532 par la protéine ARD1 a par ailleurs été décrite comme pouvant améliorer l'interaction des HIFs hydroxylés avec pVHL [232].

En absence d'oxygène, les PHDs sont inhibées, ce qui induit une stabilisation des HIFs, leur translocation au noyau, et leur hétérodimérisation avec la sous unité β (ARNT). Cet hétérodimère est alors capable de recruter les protéines p300 et CBP, pour permettre l'activation transcriptionnelle des gènes cibles des HIFs (Figure 16B). La régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF1 α peut également être médiée par une autre dioxygénase, la protéine FIH-1 (Factor Inhibiting HIF), responsable de l'hydroxylation de l'arginine en position 803. Cette modification post-traductionnelle inhibe en effet l'interaction de HIF1 α et des protéines CBP et P300, et ainsi la transcription des gènes cibles de ce complexe transcriptionnel. Les HIFs disposent en effet de deux domaines de trans-activation : un domaine situé en N-terminal, le NAD, siège des hydroxylations et de l'acétylation impliquées dans la reconnaissance par la protéine pVHL, et le CAD, en C-terminal siège de l'hydroxylation par FIH-1, responsable de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle [232].

Les mutations des gènes *SDHx* et *VHL* ont pour conséquence une stabilisation anormale des HIFs, en présence d'une concentration normale en oxygène, on parle alors de « pseudo-hypoxie ». Les mutations des gènes *SDHx* induisent une inactivation complète et sélective de l'activité enzymatique de la SDH, ce qui aboutit à l'accumulation de son substrat, le succinate, qui est également le produit de la réaction d'hydroxylation des HIFs. Il se comporte comme un inhibiteur compétitif, inhibant ainsi l'activité des PHDs et la dégradation des HIFs. Les mutations du gène *VHL* sont quant à elles responsables de la non-reconnaissance des HIFs, même hydroxylés, qui ne peuvent donc plus être ubiquitinés et dirigés vers le protéasome (Figure 16C) [233].

Les hétérodimères HIF α/β sont capables d'induire la transcription de leurs gènes cibles, *via* la reconnaissance des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE, hypoxia response element) présents dans les promoteurs de ceux-ci. En réponse à l'hypoxie, mais aussi à la pseudo-hypoxie, une multitude de gènes vont alors être induits. Ce sont notamment des gènes impliqués dans le contrôle de

l'angiogenèse (VEGF, VEGFR), de la prolifération cellulaire (cycline D2), de la survie et de la résistance à l'apoptose (NIP3), du métabolisme (GLUT1, GLUT3, HK), du processus métastatique (LOXL2, TWIST, SNAIL), de l'adhésion, de la modulation du cytosquelette (cytokératines) ou encore de la matrice extracellulaire (MMPs) [232].

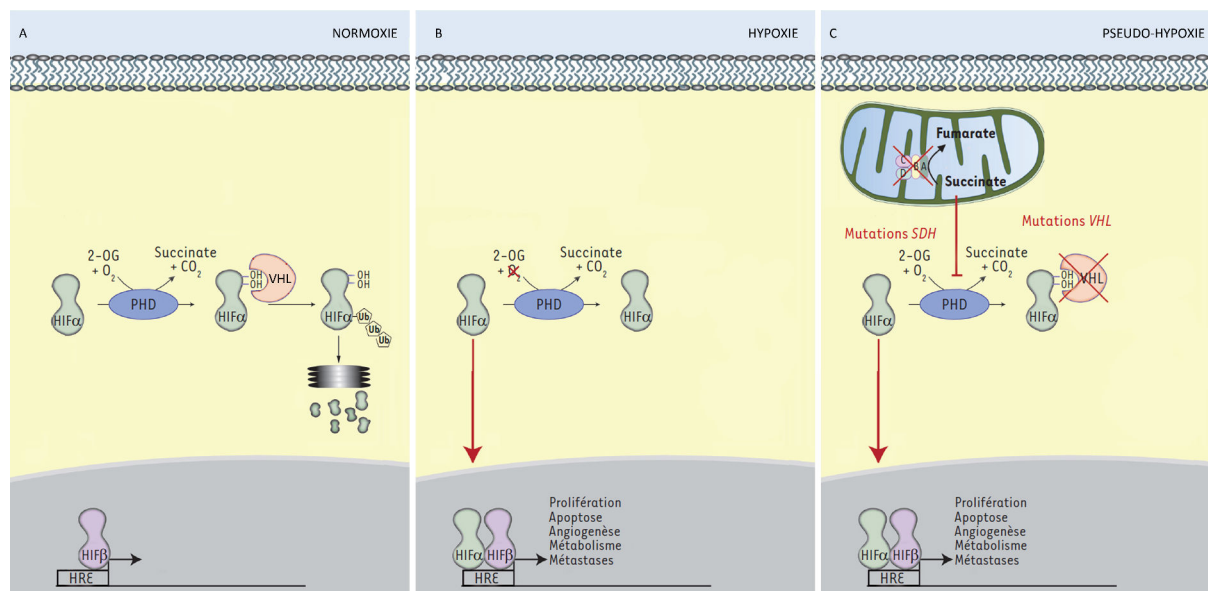


Figure 16 : Réponses cellulaires aux variations d'oxygène

Les cellules sont capables de s'adapter aux variations de pression d'oxygène, *via* la régulation oxygène-dépendante des HIFα. En normoxie les HIFα sont dégradés et n'ont pas d'action cellulaire (A) ; en hypoxie ils sont stabilisés, ce qui permet l'expression des gènes cibles responsables de l'adaptation cellulaire (B). Les mutations *SDHx* et *VHL* miment l'hypoxie en stabilisant les HIFs, on parle de « pseudo-hypoxie » (C). Adapté de Favier, 2012 [228].

B. Prolifération et survie cellulaire

Parmi les cascades moléculaires responsables de la cancérogenèse, on retrouve dans de très nombreux cancers l'activation des récepteurs à activité TK, capables d'induire une signalisation cellulaire importante *via* une transduction de signaux depuis la membrane jusque dans le noyau, où elle permet la régulation de l'expression de gènes, et notamment de gènes responsables du contrôle de la prolifération, de la croissance et de la survie cellulaire.

Parmi les gènes de prédisposition aux PCC/PGL, les gènes *RET*, *NF1* et *TMEM127* sont impliqués dans cette voie de tumorigénèse (Figure 17).

Les mutations activatrices du récepteur RET, qui conduisent à sa dimérisation constitutive, ont pour conséquence une transduction permanente et non régulée du signal de transduction. L'autophosphorylation du récepteur permet le recrutement de complexe protéique induisant l'activation de la voie RAS/RAF/MAPK, et de la voie PI3K/AKT/mTOR. Les protéines de la famille RAS, sont capables de lier le GTP (elles sont alors sous forme active), ce qui active RAF, qui induit la phosphorylation activatrice des MAPKs, à leur tour responsables d'une cascade de phosphorylations

activatrices de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de gènes associés à la prolifération, à la croissance et à la survie cellulaire [234].

NF1 est responsable de l'activation de RAS, puisqu'elle régule sa liaison au GTP en réalisant la conversion RAS-GTP/RAS-GDP. L'inactivation de NF1 est donc activatrice de la voie RAS, par inhibition de la conversion du GTP en GDP [235]. TMEM127 est une protéine décrite comme étant un modulateur de l'expression de mTOR, l'un des acteurs de la voie PI3K/AKT [201]. MAX, qui est un partenaire de l'oncogène MYC, est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes codant notamment pour des cyclines. Les mutations *MAX* sont donc elles aussi responsables d'une prolifération incontrôlée des cellules [236].

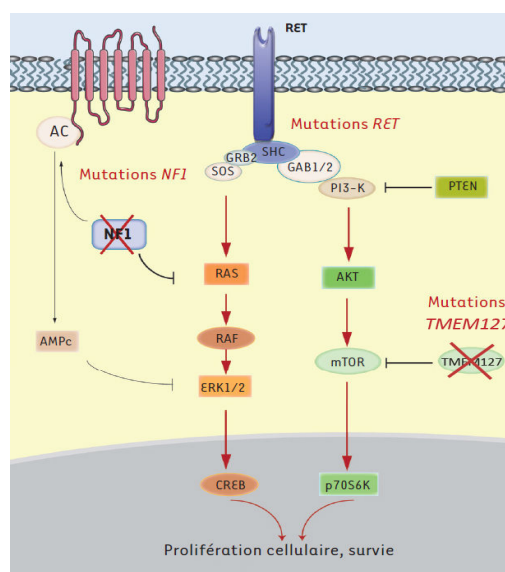


Figure 17 : Rôle des voies RAS/RAF/MAPK et AKT/mTOR dans la tumorigenèse

Les mutations des gènes *RET*, *NF1* et *TMEM127*, ont pour conséquence une activation constitutive ou une levée d'inhibition des voies RAS/RAF/MAPK et AKT, qui se traduit par une induction de la prolifération et de la survie cellulaire. Adapté de Favier, 2012 [228].

C. La voie de l'apoptose PHD3-dépendante

Lee et al. ont suggéré l'existence d'une troisième voie de tumorigenèse qui pourrait être commune aux tumeurs porteuses de mutations sur les gènes *RET*, *NF1*, *VHL* et *SDHx*.

Les précurseurs de neurones sympathiques subissent au cours du développement une apoptose dite « développementale », nécessaire pour assurer la différenciation d'un nombre adéquat de neurones. Elle est orchestrée par des facteurs neurotrophiques tels que le Nerve Growth Factor (NGF) sécrétés en quantités limitantes. Les cellules n'ayant pas accès au NGF (près de 50% des neurones) subissent une apoptose dépendante de la prolyl-hydroxylase Egln3 (PHD3) (Figure 18A) [237].

Dans cette étude, les auteurs suggèrent que cette voie pourrait être régulée à différents niveaux par les protéines NF1, RET, pVHL et SDH, proposant ainsi une voie de tumorigenèse commune à ces tumeurs. En effet RET semble pouvoir induire une signalisation du NGF tout comme son récepteur

propre le TrkA, que NF1 serait capable d'inhiber. Les mutations activatrices et inactivatrices respectives de *RET* et de *NF1* seraient donc de potentielles activatrices de la voie de signalisation TrkA (inhibitrice de l'apoptose). pVHL et la SDH seraient quant à elles, lorsqu'elles sont mutées, respectivement responsables de l'inhibition de c-Jun et d'Egln3, *via* la stabilisation et l'accumulation de JunB et de succinate, et donc ainsi inhibitrices de l'apoptose (Figure 18B) [238]. L'étude de Schlisio et al. suggère par ailleurs, que KIF1B β soit un acteur de cette voie, agissant en aval de Egln3 pour induire l'apoptose développementale [204].

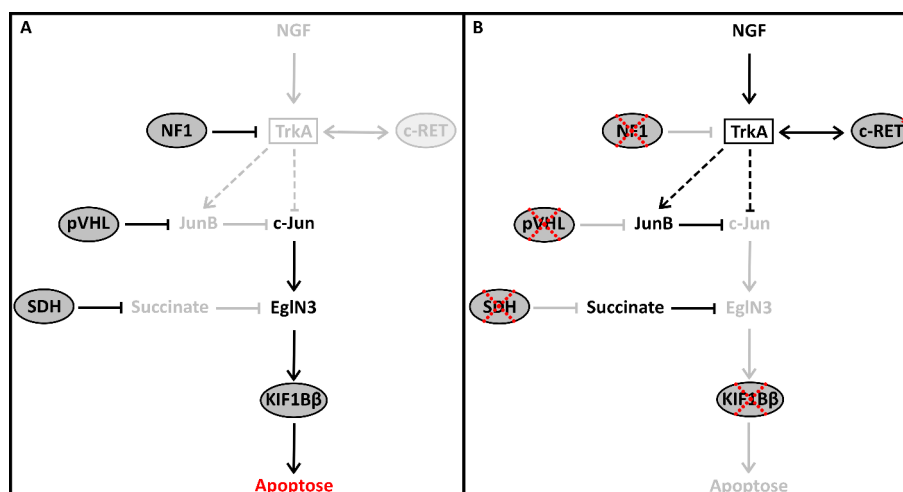


Figure 18 : Implication de la voie du NGF dans la tumorigenèse des PCC/PGL

A) Au cours du développement, la disponibilité en NGF diminue et induit l'apoptose Egln3-dépendante dans les précurseurs de neurones sympathiques. B) Les mutations activatrices de *RET*, et inhibitrices des gènes *NF1*, *VHL* et *SDHx* participent à l'inhibition de cette apoptose développementale. Adapté de Lee et al., 2005 [238].

D. Thérapies ciblées

Les multiples découvertes sur les mécanismes responsables de la cancérogénèse et de la malignité des tumeurs ont permis le développement des thérapies dites « ciblées », dont l'objectif n'est plus l'élimination des cellules en division comme avec la chimiothérapie, mais l'inhibition des voies de signalisation requises pour la croissance tumorale et pour les processus métastatiques qui sont, elles, spécifiques des cellules cancéreuses.

Les PCC/PGL malins présentent notamment une surexpression du VEGF (vascular endothelial growth factor) dont les récepteurs sont à activité tyrosine kinase (RTK). Les inhibiteurs de RTK (ou TKI), sont de petites molécules, aux cibles généralement multiples, qui sont très utilisées aujourd'hui et pour lesquelles il existe des données concernant la prise en charge de PCC/PGL métastatiques. Il existe différents TKI, comme le sunitinib (aux propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales), dont l'efficacité sur les PCC/PGL malins a été suggérée par la description initiale du traitement de quelques cas dans le cadre d'une maladie de VHL [239], d'une forme *SDHB*-dépendante et d'une tumeur sporadique [240]. A l'heure actuelle 21 cas ont été rapportés : 33% de réponse partielle, 28% de stabilisation et 39% de progression (cf. Table 12). L'efficacité du sunitinib est actuellement évaluée

dans le cadre du premier essai clinique international randomisé lancé pour le PCC/PGL métastatique progressif (FIRSTMAPPP, cf. <http://firstmappp.fr/>).

L'imatinib (notamment utilisé dans le traitement des GIST) et le thalidomide (un agent alkylant dérivé de la dacarbazine, utilisé en combinaison avec du témozolomide dans le traitement des glioblastomes), sont deux autres inhibiteurs de RTK décrits dans la prise en charge de PCC/PGL métastatiques (cf. Table 21). Seuls des cas isolés ont été rapportés et des données à plus grandes échelles sont encore manquantes [241, 242]. Une collaboration récente établie entre notre équipe et le service d'oncologie endocrinienne de l'Institut Gustave Roussy a permis de montrer que le statut *SDHB* pouvait être considéré comme un biomarqueur prédictif de la réponse au témozolomide à travers l'étude de 15 patients avec PCC/PGL malins traités par témozolomide (cf. Annexes II). La survie sans progression était significativement plus longue chez les sujets avec mutations *SDHB* (19,7 mois) que chez les sujets sans mutation *SDHB* (2,9 mois). Nous avons montré que les mutations *SDHB* sont responsables d'une hyperméthylation globale de l'ADN (voir Paragraphe I. 9. Mitochondrie et cancer) et du promoteur du gène *MGMT* en particulier. Ainsi la sous-expression de cette enzyme responsable de la stabilité du génome (par réparation des lésions de l'ADN) a pour conséquence une augmentation de l'activité anti-tumorale médiée par le témozolomide, qui est donc plus particulièrement indiqué chez les sujets ayant un statut *SDHB* muté [243] (voir Annexes II).

La voie mTOR, impliquée dans la synthèse protéique, la survie cellulaire et l'angiogenèse a été suggérée comme pouvant être une voie compensatrice, induite dans les PCC/PGL métastatiques résistants aux traitements. Un cas de PCC métastatique redevenu progressif sous sunitinib a d'ailleurs été rapporté comme stabilisé par traitement à la rapamycine [244]. Cependant les deux études ayant évalué l'efficacité de l'everolimus (RAD001, inhibiteur de mTOR) dans le traitement des PCC/PGL métastatiques ont conclu à l'absence d'effet de la molécule (cf. Table 12) [94, 245, 246].

Molécules	Nb cas	Descriptif des tumeurs	Évolution	Référence
Inhibiteurs RTK :				
- Sunitinib	3	- 2 <i>SDHB</i> , 1 spo	- 67% RP, 33% MP	[239, 240, 244]
	1	- <i>VHL</i>	- RP	
	17	- 8 <i>SDHB</i> , 1 <i>VHL</i> , 8 spo	- 21% RP, 36% MS, 43% MP	
- Imatinib	2	- ND	- 100% MP	[241]
- Thalidomide/témozolomide	3	- ND	- 33% RP	[242]
- Témzolomide	15	- 10 <i>SDHB</i> , 5 spo	- 33% RP, 47% MS, 20% MP	[243]
Inhibiteur mTOR :				
- Everolimus	2	- ND	- 100% MP	[245, 246]
	5	- ND	- 71% MS, 29% MP	
- Rapamycine	1	- <i>SDHB</i> , sunitinib	- MS	[244]

Table 12 : Thérapies ciblées utilisées dans la prise en charge des PCC/PGL métastatiques

Spo : sporadique, ND : non déterminé, RC : réponse complète, RP : réponse partielle, MS : maladie stable, MP : maladie progressive

Le 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin, ou tanespimycin, est un inhibiteur de HSP90 (décrite comme surexprimée dans les PCC/PGL malins, voir Paragraphe I. 10. Malignité), dont l'utilisation paraît prometteuse, cependant il n'y a pas à ce jour de données concernant l'utilisation de cette drogue dans le traitement des PCC/PGL métastatiques [94, 247].

II. LE CAS PARTICULIER DU GÈNE *SDHB*

Suite à ces années de recherches actives sur les PCC/PGL, et en particulier depuis l'essor de la génétique, la compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent l'émergence de ces tumeurs a progressé de façon radicale. Cependant, les mécanismes responsables de la transformation maligne des PCC/PGL demeurent encore mal connus et leur diagnostic aussi bien que leur prise en charge thérapeutique reste à améliorer. Dans ce contexte, les découvertes liées aux mutations du gène *SDHB* ont constitué le progrès le plus significatif réalisé dans le domaine au cours des dix dernières années et constituent donc le centre de mon travail de thèse.

1. Un facteur de mauvais pronostic

La première description, par Gimenez-Roqueplo et al. en 2002, d'une mutation non décrite jusque-là du gène *SDHB* chez une patiente atteinte d'un PGL apparemment sporadique malin, a conduit à la découverte d'une association entre les mutations sur ce gène et la malignité des PCC/PGL. Dans cette tumeur, la mutation constitutionnelle du gène *SDHB* était associée à une LOH au locus 1p, ayant pour conséquence une perte totale et sélective de l'activité enzymatique de la SDH, ainsi qu'une activation de l'angiogenèse (traduite par l'induction des ARNm du VEGF et de HIF2 α (appelé à l'époque EPAS1) observées par PCR quantitative et par hybridation *in situ*) [248].

Suite à cette étude princeps mon équipe d'accueil a démontré, sur une cohorte de 84 patients, que 9.5% des tumeurs apparemment sporadiques étaient porteuses de mutations constitutionnelles sur le gène *SDHB*. Cinq des 8 patients (62,5%) ayant développé une forme maligne de la maladie, confirmant ainsi l'association des mutations *SDHB* avec le caractère métastatique des PCC/PGL [249]. Ces mutations étaient associées à une LOH en 1p, une perte d'activité enzymatique de la SDH, et à l'architecture vasculaire atypique caractéristique des tumeurs malignes [68]. Il a ainsi été établi que les patients porteurs de mutations sur le gène *SDHB* avaient un risque 19 fois plus élevé de récurrence ou de développement de métastases [249]. Cette forte proportion de mutations *SDHB* chez des patients ayant une présentation apparemment sporadique (sans histoire familiale) est notamment liée à la faible pénétrance de ces mutations comparativement par exemple à la forte pénétrance des mutations *SDHD*, où les patients porteurs ont le plus souvent une histoire familiale et/ou des tumeurs multiples [226, 250]. Ces travaux ont renforcé la nécessité des tests génétiques pour tous les patients ayant une PCC/PGL, même apparemment sporadique.

L'étude rétrospective d'Amar et al. en 2007 a ensuite montré que les mutations du gène *SDHB* sont, en plus d'être un critère de malignité des tumeurs, un critère de mauvais pronostic. En effet dans cette étude portant sur 54 patients ayant une tumeur maligne, les auteurs ont montré une association entre le statut génétique des patients (présence ou non d'une mutation sur le gène *SDHB*) et leur survie. La survie médiane après le diagnostic de la première métastase était de 244 mois en absence de mutation *SDHB*, *versus* 42 mois pour les porteurs d'une mutation. La probabilité de survie à 5 ans était également réduite, passant de 67% à 36% en présence d'une mutation sur le gène *SDHB* [251].

Toutes les mutations du gène *SDHB* sont susceptibles d'induire une tumorigenèse agressive dans un délai relativement court après le diagnostic. De ce fait, aucune corrélation entre la nature des

mutations et le phénotype des patients n'a pu être démontrée. Les sites métastatiques les plus fréquents après les ganglions lymphatiques sont les os, le foie et les poumons, quel que soit le statut génétique. En revanche les mutations du gène *SDHB* sont responsables d'une réduction importante du délai d'apparition de ces métastases. Celui-ci est en moyenne de 4 mois chez les porteurs de mutation sur le gène *SDHB* contre 20 mois en moyenne dans les autres cas de tumeurs malignes. Ce délai peut d'ailleurs être considérablement long, certaines tumeurs ont été décrites comme ayant présenté des métastases près de 20 ans après le diagnostic de leur tumeur initiale [251]

De nombreuses études ont été depuis menées pour confirmer l'impact des mutations *SDHB* sur l'invasivité des PCC/PGL. Toutes ces études valident cette association entre mutations *SDHB* et agressivité tumorale chez l'adulte comme chez l'enfant [153, 252, 253] (Table 13).

Etude	Nb de tumeurs B/M (%M)	Nb <i>SDHB</i> malin	% <i>SDHB</i> parmi les malins	% malin parmi les <i>SDHB</i>	Référence
Gimenez-Roqueplo et al.	63/21 (25%)	5	23,8%	62,5%	[249]
Neumann et al.	392/25 (5,9%)	11	44%	34,4%	[168]
Amar et al.	0/54 (100%)	23	42,6%	NA	[226]
Brouwers et al.	0/44 (100%)	13	29,5%	NA	[254]
Boedeker et al.	187/8 (4,3%)	7	87,5%	53,8%	[255]
Burnichon et al.	396/49 (11%)	36	73,6%	37,5%	[256]
King et al.	17/32 (65,2%)	23	71,8%	85,2%	[252]

Table 13 : Implication du gène *SDHB* dans les PCC/PGL malins

NA : non applicable

Une méta-analyse, publiée en 2012, regroupe les données de plus de 500 échantillons tumoraux porteurs de mutations sur le gène *SDHB*. Elle décrit ainsi une incidence de 17,5% de PCC/PGL malins chez les sujets porteurs de mutations du gène *SDHB*, et une prévalence moyenne de 23% (de 0 à 54% selon les études) [253].

2. Particularités des tumeurs *SDHB*-dépendantes

Il n'y a pas d'association entre le sexe, l'âge moyen au diagnostic, le poids ou la taille tumorale, ou encore les caractéristiques biochimiques et le statut génétique (présence ou non d'une mutation sur le gène *SDHB*). En revanche la localisation des tumeurs primaires, l'âge, et le délai d'apparition des métastases sont associés au statut *SDHB* [251].

A. Localisation

Plusieurs études ont décrit des localisations préférentiellement thoraco-abdomino-pelviennes et extra-surrénales des tumeurs primaires chez les porteurs de mutations du gène *SDHB*, avec un risque 19,8 fois plus élevé de développer ce type de tumeurs [249]. Les tumeurs *SDHB* mutées sont dans près de 70% des cas localisées dans l'abdomen, le thorax ou le pelvis, bien que les localisations au niveau de la tête et du cou représentent près d'un tiers des localisations tumorales [21, 168, 251, 257].

B. Profil sécrétoire

Les tumeurs *SDHx*, et notamment les tumeurs *SDHB*-dépendantes, produisent de façon préférentielle de la noradrénaline (ou norépinéphrine) et/ou de la dopamine. En effet, il a été montré une sous-

expression de PNMT dans les tumeurs *SDHx*-dépendantes qui sont donc incapables de produire de l'adrénaline (ou épinéphrine) [12, 200]. Ceci a été expliqué au cours de ma thèse par la mise en évidence des modifications épigénétiques induites par l'inactivation de la succinate déshydrogénase. Ainsi le gène le plus hyperméthylé et le plus sous-exprimé dans les PCC/PGL *SDHB*-dépendants est celui qui code pour la PNMT (cf. Section Résultats : Rôle de la méthylation dans la régulation de l'EMT).

La description de PCC/PGL au profil de sécrétion atypique, apparemment non sécrétants ou sécrétants de la dopamine et ne présentant pas les symptômes classique dus à l'hypersécrétion de catécholamines, a suggéré le dosage de la dopamine (DA) ainsi que celui de ses métabolites O-méthylés (la méthoxytyramine, MTY) pour l'identification de ces tumeurs [10]. Depuis, plusieurs études de Timmers et al. ont montré que 10% des tumeurs *SDHB* mutées étaient biologiquement silencieuses. Ils ont ainsi décrit 4 tumeurs malignes *SDHB* mutées, sécrétrices de dopamine, révélées tardivement par une simple fatigue et/ou une thrombose veineuse due à la compression tumorale [4, 258].

Une récente étude rétrospective portant sur le dosage de 18 composés (les catécholamines et leurs métabolites) a permis d'établir que le dosage de la méthoxytyramine était plus sensible que le dosage de la dopamine pour la détection des tumeurs dopaminergiques. Cette étude comprenant 365 patients dont 48 porteurs de mutations du gène *SDHB*, comportait 105 cas ayant développé une forme maligne de leur maladie (dont 41 *SDHB*-mutés). Cette large cohorte a permis aux auteurs d'établir que la sécrétion de DA et de MTY était largement supérieure dans les tumeurs malignes comparativement aux tumeurs bénignes, ceci étaient le reflet d'une sécrétion 40 fois plus importante par les tumeurs *SDHB* malignes [76].

C. Spécificités à l'imagerie

L'imagerie fonctionnelle (PET) présente des sensibilités et des spécificités différentes en fonction des localisations tumorales mais aussi en fonction du génotype des patients, ceci est particulièrement vrai en fonction du statut *SDHB* des patients. Comme l'ont observé Timmers et al., le PET ^{18}F -FDA ou ^{18}F -FDG permettent de mettre en évidence les tumeurs *SDHB*-mutées avec une bonne sensibilité (82 et 83% respectivement). En absence de mutation sur ce gène, le ^{18}F -FDOPA est une technique très sensible (93%), alors que cela n'est pas le cas chez les patients *SDHB*-mutés (20%, voir aussi Figure 19) [259].

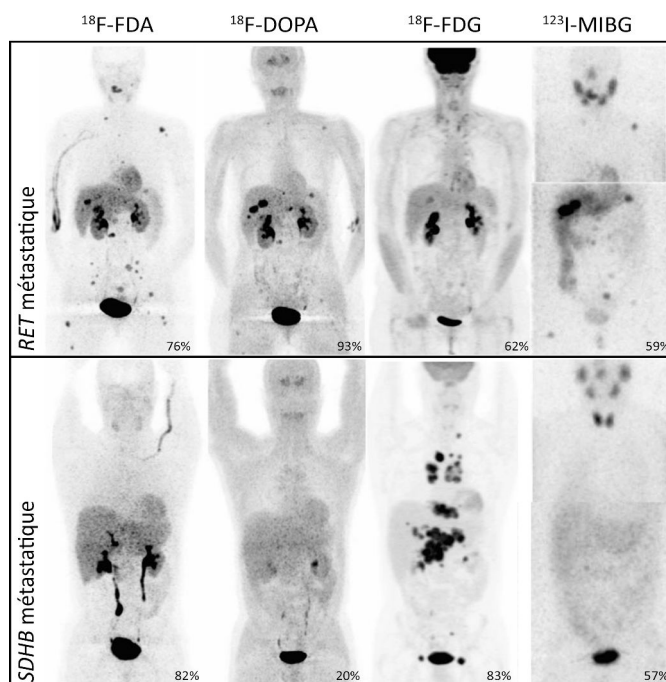


Figure 19 : Les particularités d'imagerie des patients *SDHB*-malins.

Adapté de Timmers et al. [259]

Ainsi, et malgré son apparente plus faible spécificité, l'imagerie fonctionnelle utilisant le ^{18}F -FDG a été montrée comme étant très informative pour la mise en évidence des tumeurs porteuses de mutation sur le gène *SDHB* (et *SDHD*). Timmers et al. ont en effet observé une meilleure sensibilité de ce traceur PET (comparativement à la scintigraphie à l' ^{123}I -MIBG), chez les patients *SDHB*-mutés, et ce quelle que soit la localisation : tumeur primaire (PCC, PGL ou HNPGL) ou métastases. Ils ont par ailleurs mis en évidence un avantage à utiliser le ^{18}F -FDG par rapport à de l'imagerie conventionnelle pour la détection des métastases osseuses, avec une spécificité bien meilleure (90,2% contre 70,5%) [260].

En dépit de ces caractéristiques cliniques bien définies, aucune des études fonctionnelles ou d'expression (par hybridation *in situ*, PCR, immunohistochimie ou analyses transcriptomiques) n'avait permis, avant mes travaux de thèse, de mettre en évidence de différences moléculaires ou biochimiques permettant d'expliquer le phénotype particulier des tumeurs *SDHB*. Ainsi, les tumeurs porteuses de mutations *SDHB* conduisent, comme les autres tumeurs *SDHx*, à une accumulation de succinate causée par la perte complète de l'activité SDH, à une signature pseudo-hypoxique et à une augmentation de l'angiogenèse. Mais on ignorait les voies de signalisation spécifiquement activées dans ce sous-groupe de tumeurs particulièrement agressives. Afin de les identifier, nous avons choisi une approche « candidat » et nous nous sommes intéressés à une voie de transformation métastatique impliquée dans de nombreux types de cancers : la transition épithélio-mésenchymateuse.

III. LA TRANSITION ÉPITHÉLIO-MÉSENCHYMATEUSE ET L'ÉCHAPPEMENT TUMORAL

1. Concept général : les transitions épithélio-mésenchymateuses

Le mésoderme constitue l'un des trois feuillets embryonnaire avec l'endoderme et l'ectoderme. Présent chez tous les *Bilatériens*, il est mis en place très tôt dans l'embryogenèse, au cours de la gastrulation ce qui nécessite le changement de forme, l'invagination et la migration de cellules initialement de type épithéliales, mais dès lors dénommées mésenchymateuses. On parle donc de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

C'est Elizabeth Hay qui décrit pour la première fois ce phénomène dans l'embryon de poulet, à la fin des années 1960. Quelques années plus tard, avec Gary Greenburg ils mirent en évidence que ce mécanisme pouvait également se produire dans les tissus adultes. Ils démontrèrent ainsi que des cellules mésenchymateuses peuvent dériver de cellules épithéliales adultes et embryonnaires dans des contextes indépendants de l'embryogenèse et de l'organogenèse [261]. Depuis, le processus d'EMT a été décrit et caractérisé dans de nombreuses conditions, physiologiques (au cours de l'embryogenèse, de la morphogenèse ou encore de la régénération tissulaire) mais aussi pathologiques (au cours de la fibrose tissulaire et de la progression tumorale). Il est également établi que ce processus temporaire est également réversible, par une voie nommée transition mésenchymo-épithéliale (MET) [262].

A. Les EMT physiologiques

a. Développement embryonnaire, morphogenèse et organogenèse

Gastrulation

La gastrulation se produit au cours de l'embryogenèse humaine, entre le 15^{ème} et le 17^{ème} jour de développement. Elle assure la mise en place des feuillets embryonnaires, et notamment celle du mésoderme. Il s'agit des premiers mouvements cellulaires après la phase de division, pendant laquelle l'œuf ne change ni de forme ni de taille [263].

Les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation peuvent impliquer une couche de cellules (un épithélium), on parle alors d'invagination ou d'involution, ou au contraire impliquer le déplacement de cellules isolées, ayant déjà perdu leurs interactions intercellulaires, on parle alors plutôt d'ingression cellulaire.

A la suite de l'épaississement de l'ectoderme, correspondant à la formation de la ligne primitive, deux vagues de mouvements cellulaires se produisent par invagination/involution ou par ingression. La migration ventrale des cellules conduit à la formation de l'endoderme définitif, tandis que la migration transversale entre l'endoderme primaire et l'endoderme définitif permet la mise en place du mésoderme et de la notochorde [264]. Cette étape qui aboutit à la formation d'un disque embryonnaire à trois feuillets, nécessite le changement de forme, l'invagination, l'ingression et la migration de cellules issues de l'endoderme primaire, il s'agit de la première vague d'EMT (Figure 20).

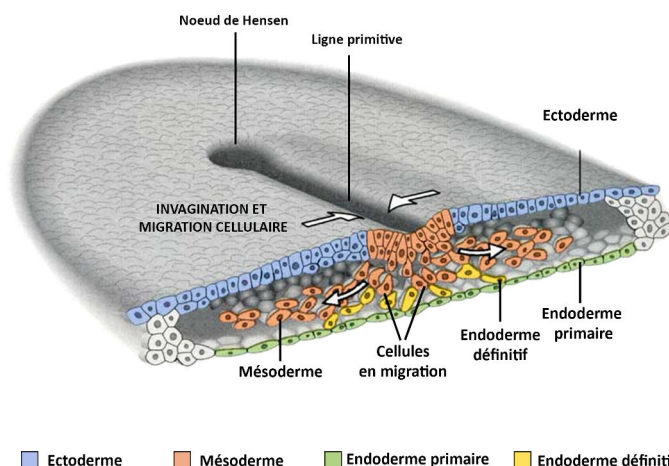


Figure 20 : Représentation schématique des mouvements cellulaires lors de la gastrulation.
Adapté de Wolpert and Tickle [265].

Crêtes neurales

La fin de la 3^{ème} semaine de développement (du 19^{ème} au 21^{ème} jour) est caractérisée par la différenciation de l'ectoderme en neuroectoderme et en endoderme, ce qui permet la mise en place de la gouttière neurale. Au 20^{ème} jour, les bords de la gouttière se relèvent et fusionnent au 21^{ème} jour, on parle alors de neurulation (formation et fermeture du tube neural). Les bords de ce tube constituent les crêtes neurales, une structure embryonnaire transitoire spécifique des *Vertébrés*. La fermeture complète du tube neural coïncide avec l'isolation des crêtes neurales qui se fragmentent en amas cellulaires : les cellules des crêtes neurales. Rapidement après la fermeture du tube neural, ces cellules migrent ventralement et latéralement depuis la ligne médiane dorsale (migration rostro-caudale). Après migration, et différenciation locorégionale, les cellules des crêtes neurales donnent naissance à de nombreux dérivés, comme le squelette et le cartilage cranio-faciaux, les neurones des systèmes nerveux autonome et sensitif, les cellules gliales, les mélanocytes ou encore les cellules chromaffines de la médullosurrénale [1, 266, 267] (Figure 21).

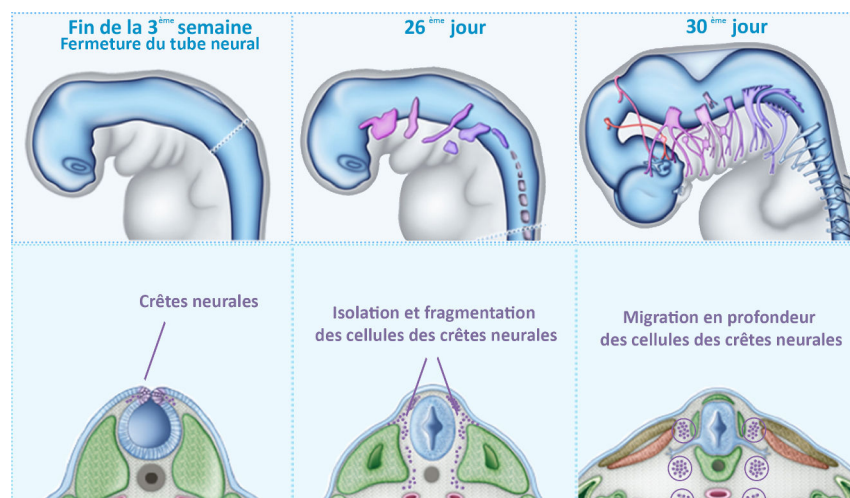


Figure 21 : Représentation schématique de l'origine et de la migration des cellules issues des crêtes neurales.
(Adapté de <http://virtuel.cochin.univ-paris5.fr/embryologie/Accueil/Accueil.htm>)

La perte des interactions avec les cellules neuroépithéliales, la délamination cellulaire (séparation d'un tissu en différentes populations cellulaires) et la migration des cellules en profondeur dans le mésenchyme, constituent les événements séquentiels de la seconde vague d'EMT embryonnaire.

Métamérisation et formation de somites

Les somites (ou métamères) sont à l'origine de la segmentation de l'embryon, qui est l'une des caractéristiques des *Vertébrés*. Ces amas cellulaires qui dérivent du mésoderme paraxial sont repartis de façon séquentielle en position rostro-caudale de part et d'autre du tube neural. Les somites constituent une organisation temporaire de l'embryon en plusieurs structures de type épithélial. L'individualisation des somites, à partir du mésoderme présomitique, s'effectue selon un axe-antéro-postérieur, chaque paire de somites étant formée à intervalle de temps régulier.

La somitogenèse est concomitante à un cycle de MET, chaque somite donnant naissance à une structure organisée : des cellules mésenchymateuses (le sclérotome) entourées d'un épithélium (le dermatomyotome). Les cellules subissent ensuite un processus d'EMT dite secondaire (voir Bilan) afin de permettre leur délamination, leur migration et leur différenciation (Figure 22). Ces différentes étapes donneront respectivement naissance à partir du sclérotome, du dermatome et du myotome, aux vertèbres, au derme et aux muscles striés squelettiques [268-270].

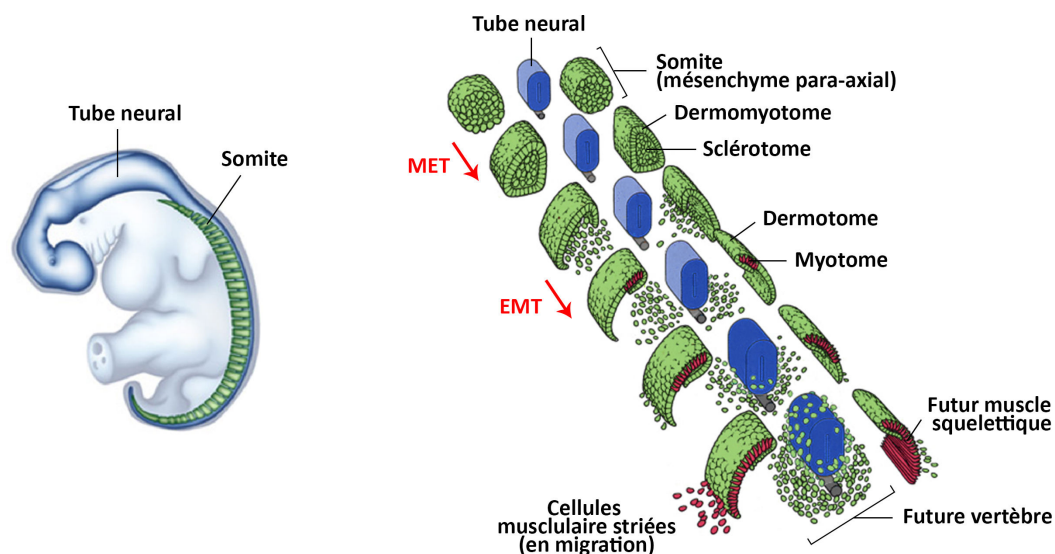


Figure 22 : Localisation et devenir des somites au cours de l'organogenèse.

(Adapté de <http://cvtuel.cochin.univ-paris5.fr/embryologie/Accueil/Accueil.htm> et de Elsevier Ltd 2005. Standing : Gray's Anatomy 39^e – www.graysanatomyonline.com)

Formation du cœur

La formation du cœur est un très bel exemple de l'importance de l'EMT et notamment des cycles EMT/MET dans la mise en place des organes. En effet 3 cycles d'EMT sont nécessaires pour aboutir à la formation complète du premier organe mis en place au cours de l'organogenèse. Lors de la gastrulation, des cellules cardiaques précurseurs sont mises en place à partir du mésoderme splanchnopleurique (1^{er} cycle d'EMT). Après un cycle de MET qui permet d'établir la splanchnopleure,

une structure épithéliale transitoire, un nouveau cycle d'EMT (le 2^{ème}) aboutit à la formation des deux tubes cardiaques primitifs (l'endocarde et le myocarde). Après fusion des deux tubes, le tube cardiaque primitif se replie sur lui-même en suivant une boucle de convexité droite, cette étape est suivie de la formation des quatre chambres constitutives du cœur, qui s'alignent les unes par rapport aux autres. Les cellules de l'endocarde suivent alors un processus d'EMT (ou plus exactement d'endoMT, pour faire référence à leur caractéristique endothéliale plutôt qu'épithéliale) qui donne naissance aux coussins endocardiaques, responsables de la formation des valves et des septums cardiaques [262, 268, 271] (Figure 23).

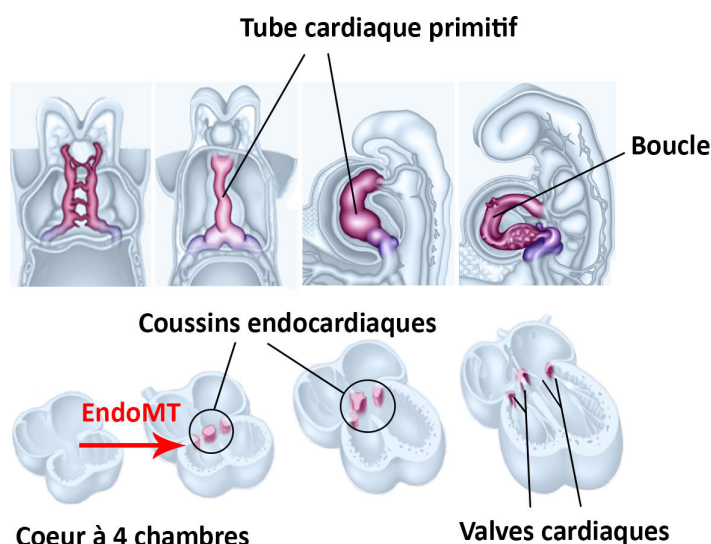


Figure 23 : Développement du cœur et cycles d'EMT associés.

(Adapté de <http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/embryologie/Accueil/Accueil.htm>)

Tractus génital masculin

Avant la différenciation sexuelle, les embryons possèdent les ébauches d'organes génitaux mâle et femelle (*i.e.* les canaux de Wolff et de Müller). Chez le mâle, les testicules fœtaux sécrètent de la substance inhibitrice müllérienne (MIS) et de la testostérone. La MIS est responsable de la régression des canaux de Müller (pas de développement d'oviducte, d'utérus, de col de l'utérus ni de vagin), la testostérone stimule quant à elle les canaux de Wolff, qui donneront naissance à l'épididyme, aux canaux déférents et aux vésicules séminales.

La MIS est une molécule de la superfamille du TGF β , capable de se fixer à ses récepteurs (MISR) afin d'induire une signalisation intracellulaire, notamment responsable de l'induction d'un processus d'EMT. Chez l'embryon mâle, lorsque les cellules de l'épithélium cœlomique (exprimant MISR) initient une sécrétion de MIS, un processus d'EMT est activé, induisant une migration des cellules en direction et autour du canal de Müller. La MIS, aux propriétés diverses, est alors capable, *via* une action paracrine, d'agir sur les cellules du canal de Müller pour induire leur apoptose, et ainsi la régression de ce canal (Figure 24) [272, 273].

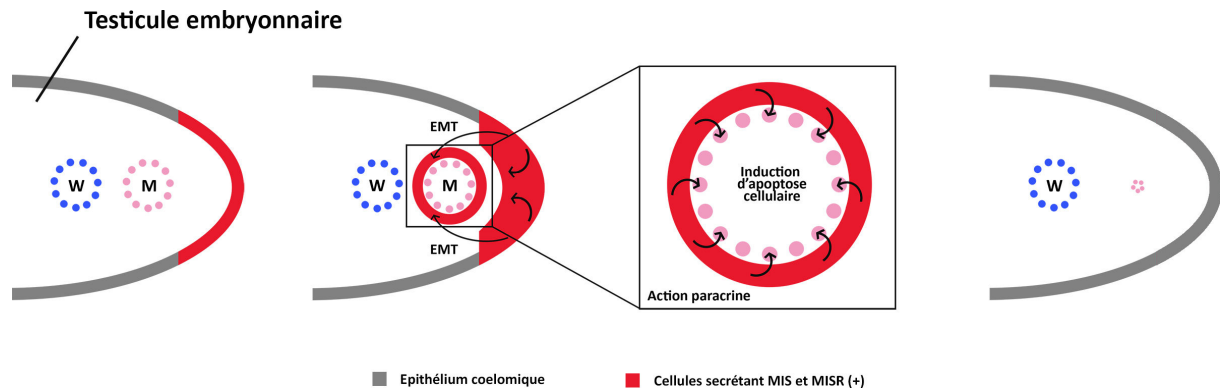


Figure 24 : Représentation schématique de l'importance de l'EMT dans la régression du canal de Müller chez l'embryon mâle. W : canal de Wolff, M : canal de Müller. Adapté de Zhan, 2006 [272].

Bilan

Au cours du développement embryonnaire, plusieurs cycles d'EMT (ou EMT/MET) sont nécessaires à la mise en place correcte du plan de l'embryon et des organes. Ces EMT conduisent progressivement à la différenciation et à la spécialisation des cellules, et peuvent être classées en EMT primaire, secondaire ou tertiaire [262] (Figure 25).

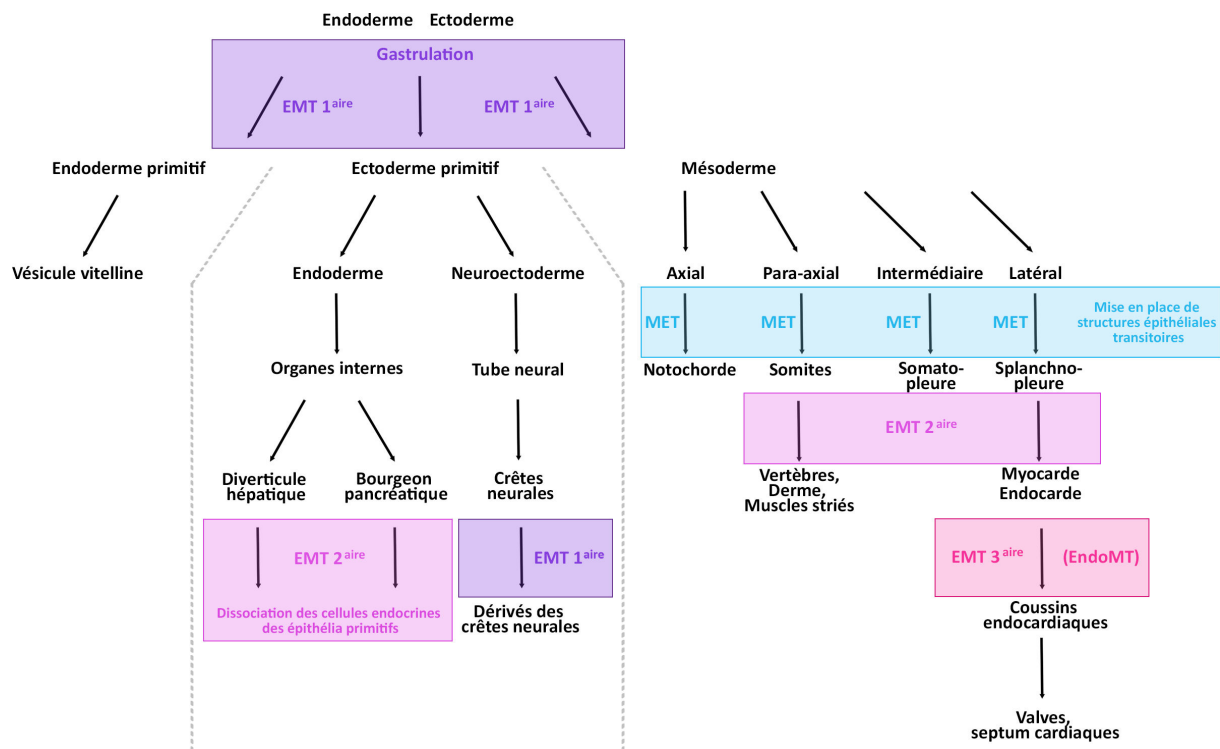


Figure 25 : Les différents cycles d'EMT au cours du développement embryonnaire.

b. Régénération tissulaire et cicatrisation

Le processus de cicatrisation cutanée représente le cas le mieux documenté d'EMT physiologique se produisant chez l'adulte. La peau constitue une barrière protectrice majeure, dont la réparation rapide en cas de lésion est nécessaire. Après une blessure, se met donc en place un processus de cicatrisation afin de retrouver et de maintenir le rôle protecteur de la peau.

L'efficacité et la rapidité de la régénération sont notamment dépendantes de l'intégrité de la lame basale. Lorsque celle-ci est atteinte, un phénomène de ré-épithélialisation est nécessaire, et se conduit en trois étapes (Figure 26). La réparation s'initie de façon temporaire, avec la formation d'un caillot sanguin constitué majoritairement de plaquettes et de fibrine. Il s'agit d'un réservoir de cytokines et de facteurs de croissance, permettant la mise en place des étapes successives : la formation d'une zone d'inflammation (recrutement de cellules immunitaires dans les quelques minutes qui suivent la blessure), et l'activation des kératinocytes situés sur les bords de la blessure. Ces derniers subissent alors un processus d'EMT réversible caractérisé par une perte de cohésion cellulaire, un relâchement des structures, une perte des adhésions cellulaires, une modulation de leur polarité et une réorganisation de leur cytosquelette. Ils acquièrent ainsi des propriétés migratoires qui leur permettent de couvrir l'ensemble de la blessure, leur prolifération assurant ensuite la ré-épithélialisation. Ces deux étapes sont ensuite suivies d'un remodelage de la matrice et d'une stabilisation de ce nouvel épithélium [274, 275].

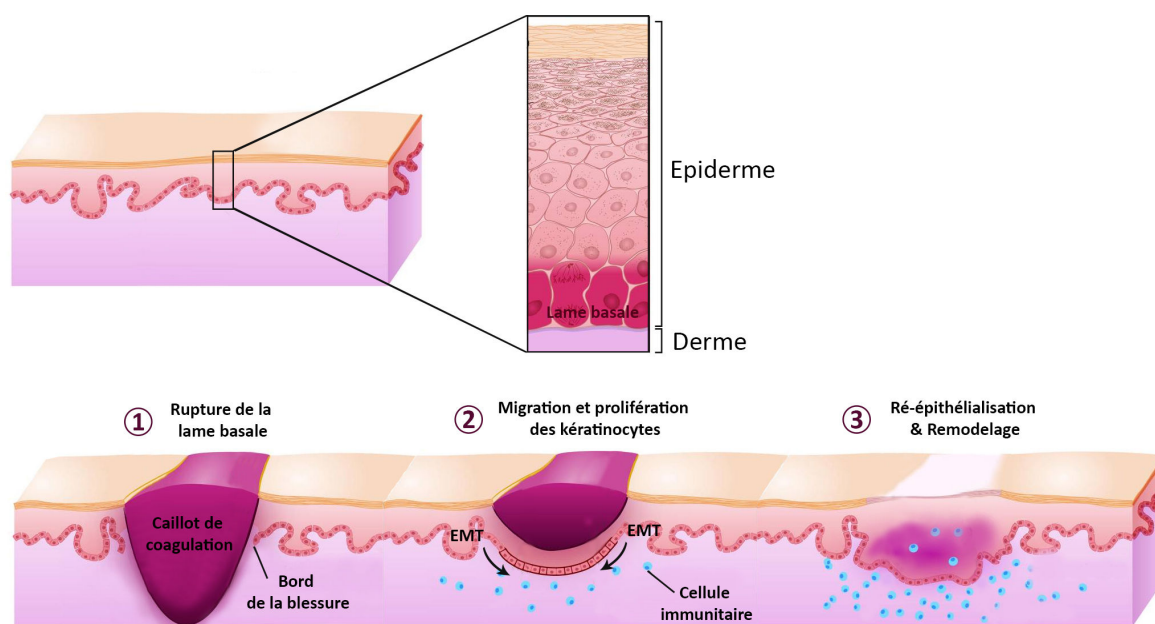


Figure 26 : Les trois étapes de la cicatrisation cutanée.

Adapté de Segre, 2006 [276]

c. Cas particulier de l'épithélium ovarien

L'ovaire est le lieu, chez la femme adulte, d'une EMT physiologique régulière, assurant à chaque cycle le maintien de l'intégrité de cet organe. L'épithélium de surface ovarien (OSE) est une structure monocouche comprenant des cellules cuboïdales. Ces cellules sont maintenues en contact par des desmosomes, des jonctions serrées incomplètes et pas des jonctions cellulaires faisant intervenir des

intégrines et des cadhérines. Cette monocouche cellulaire, à l'origine de près de 90% des carcinomes ovariens est également impliquée dans le processus d'ovulation. Par ses sécrétions de protéases, l'OSE contribue à la digestion de la MEC nécessaire pour l'expulsion de l'œuf. A la suite de celle-ci, les cellules de l'OSE participent à la reconstruction du cortex ovarien lésé. Pour cela, elles subissent un phénomène d'EMT, induit en réponse à l'inflammation, elles migrent alors dans le stroma, où elles participent à sa reconstruction et à son remodelage [277, 278].

B. Les EMT pathologiques

a. Fibrose tissulaire

La fibrose tissulaire est le résultat d'une inflammation chronique pouvant atteindre le foie, le cœur, les reins, l'intestin, les poumons, les yeux, la peau, le pancréas ou encore le cerveau. En cas de lésion, la phase régénérative (remplacement des cellules lésées) est suivie d'une phase de fibrose physiologique qui permet le remplacement du parenchyme.

La fibrose peut devenir pathologique lorsqu'elle est mal contrôlée, le tissu normal est alors remplacé par une quantité excessive de tissu cicatriciel, caractérisé par une accumulation de matrice extracellulaire (collagène) sécrétée de manière excessive par les fibroblastes de la MEC. Ce phénomène induit une altération progressive de la fonction de l'organe, qui peut dans les cas les plus graves induire sa perte et/ou être fatale [279, 280]. L'étude princeps d'Iwano et al. en 2002 a montré, dans un modèle de fibrose rénale, que l'origine des fibroblastes était mixte. Il peut s'agir de fibroblastes résidents activés par l'inflammation, de fibroblastes circulants recrutés au site d'inflammation (fibrocytes), de myofibroblastes dérivant des tubules rénaux (ayant subi un processus d'EMT) ou encore de myofibroblastes dérivant de cellules endothéliales (ayant subi un processus d'EndoMT). Les myofibroblastes, issus de cellules de type épithélial deviennent alors mésenchymateux (fibroblastiques) et ainsi capables de sécréter de la MEC [281] (Figure 27).

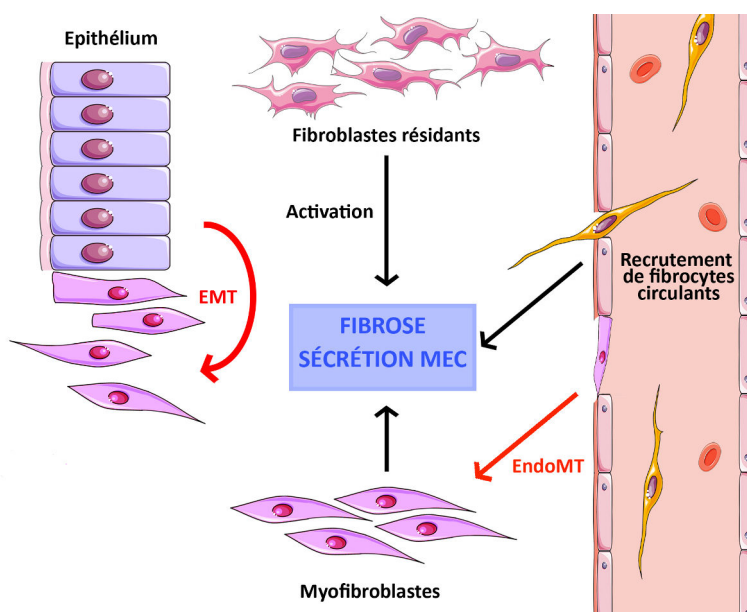


Figure 27 : Implication de l'EMT dans la fibrose tissulaire.

Adapté de Wynn et al, 2012 [282]

b. Progression tumorale

Les épithéliums sont des structures cellulaires organisées, où les cellules présentent des jonctions cellulaires entre elles et avec leur matrice extracellulaire, et reposent sur une membrane basale. Les lésions hyperplasiques peuvent atteindre les épithéliums, leur transformation maligne pouvant alors donner naissance à un carcinome (tumeur du tissu épithélial). A ce stade le carcinome présente toujours une membrane basale qui le délimite, les cellules sont toujours jointives les unes aux autres et à leur matrice : il n'est pas invasif.

La transition d'un carcinome vers un carcinome invasif, bien que très difficile à prouver dans un échantillon tumoral, résulte d'une réactivation du processus d'EMT. Les cellules perdent leurs interactions avec les autres cellules ainsi qu'avec la MEC et la lame basale est rompue rendant possible l'échappement des cellules. Les cellules perdent alors leurs facultés prolifératives, mais acquièrent des propriétés migratoires et invasives, ainsi qu'une résistance à l'apoptose (et aussi aux traitements). La dissémination métastatique (après passage dans la circulation sanguine) requiert une étape de MET, permettant aux cellules de retrouver leurs caractéristiques épithéliales, et notamment leur capacités prolifératives assurant le développement des macro-métastases (Figure 28) [262, 283, 284].

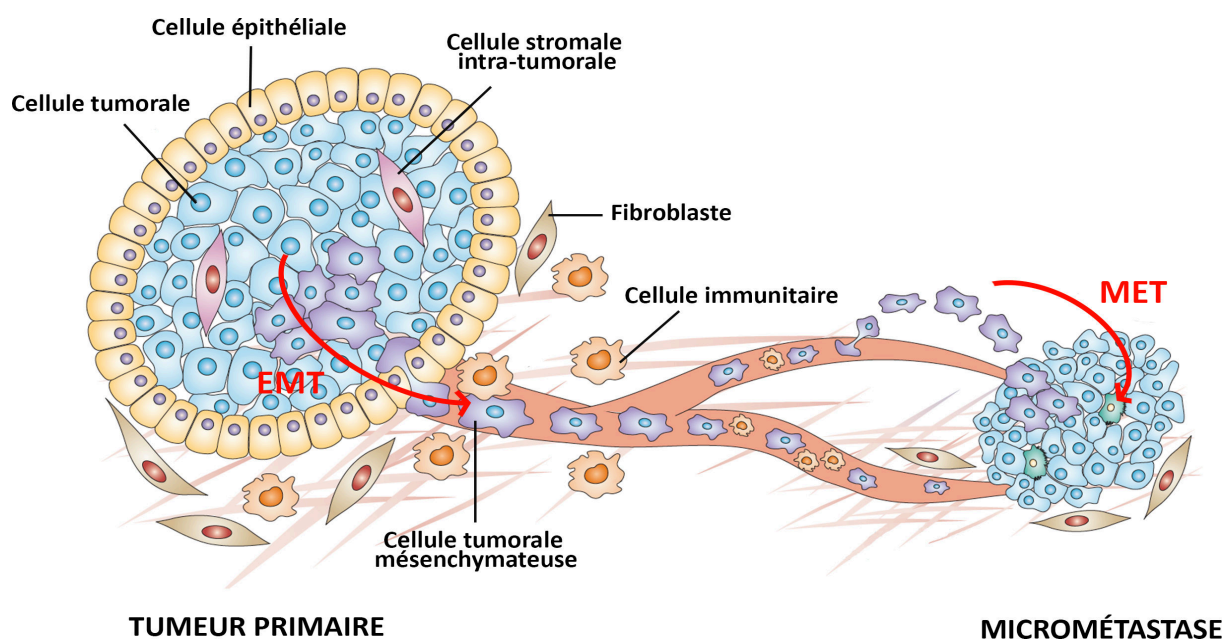


Figure 28 : Rôles de l'EMT et de la MET dans la transformation métastatique et dans la progression tumorale.
D'après Peinado et al., 2007 [283].

2. Signalisation moléculaire de l'EMT au cours de la progression tumorale

La progression tumorale est caractérisée par l'invasion de tissu(s) secondaire(s) par des cellules issues d'une tumeur primaire. L'acquisition des capacités disséminatrices nécessite des modifications cellulaires importantes, regroupées par les changements subis au cours d'une EMT. L'une des caractéristiques majeures de l'EMT au cours de la progression tumorale est la perte de la E-cadhérine, une protéine impliquée dans la formation de jonctions adhérentes entre cellules

épithéliales (voir ci-après), qui s'accompagne classiquement d'une induction de la fibronectine et de la vimentine. La E-cadhérine, codée par le gène *CDH1*, est décrite comme un suppresseur d'invasion, et subit une répression transcriptionnelle importante, médiée par des facteurs de transcription au rôle clé dans l'induction précoce de l'EMT. Ce sont les facteurs SNAILs, ZEBs, TCFs ou TWISTs, dont on sait désormais qu'ils sont capables d'induire une répression transcriptionnelle d'un nombre important de gènes codants pour des molécules responsables du caractère épithélial. Ils sont également impliqués dans la régulation de l'expression de gènes codants pour des caractères mésenchymateux, et sont eux-mêmes régulés par des signaux en provenance du stroma tumoral, notamment *via* une signalisation par le TGF β , ou par des récepteurs de type RTKs (Figure 29). L'ensemble de cette signalisation moléculaire permet d'expliquer les modulations cellulaires dues à l'EMT.

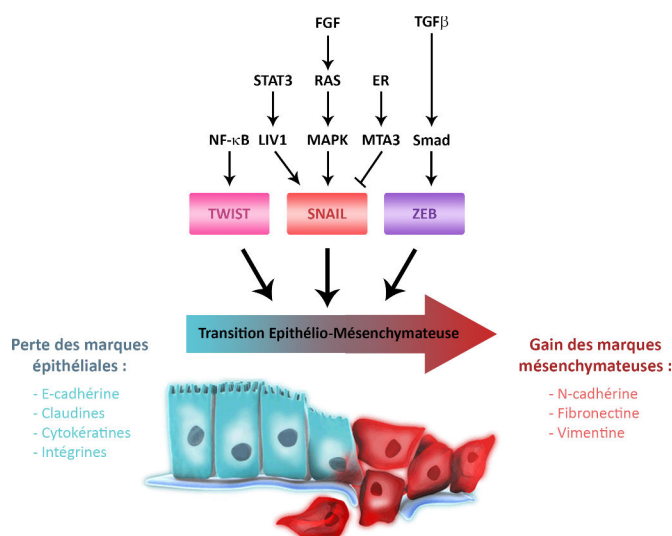


Figure 29 : Les principaux acteurs de la signalisation de l'EMT au cours de la progression tumorale.

Adapté de Kang et al., 2004 [285].

A. Les signaux extracellulaires

Les cellules tumorales évoluent dans un stroma, constitué d'une matrice extracellulaire, mais où l'on retrouve également des cellules associées, comme des fibroblastes ou des cellules du système immunitaire (notamment des macrophages). Les signaux extracellulaires, provenant de ce stroma, sont reconnus par les cellules tumorales *via* leurs récepteurs. L'EMT est induite par ces signaux, qui malgré leur divergence aboutissent tous à ce même processus. Ces signaux, initialement décrits pour leur implication dans les processus d'EMT embryonnaires ou développementaux, ont été démontrés comme responsables de l'induction de l'EMT dans un contexte tumoral (Figure 30).

a. Le TGF β

Ainsi, les molécules de la famille du TGF β (TGF β , activines et BMPs) sont directement capables, *via* la signalisation SMAD-dépendante, d'induire la transcription de facteurs clés de l'EMT comme les facteurs SNAILs, ZEBs et TWISTs (voir ci-après). De façon complémentaire, la signalisation SMAD-indépendante est également impliquée dans l'induction de l'EMT, par l'activation des voies PI3K, AKT et MAPK ainsi que par l'induction du remodelage du cytosquelette.

b. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les facteurs de croissance, dont la signalisation cellulaire est dépendante de RTK, ont eux aussi un rôle important dans l'induction de l'EMT. Ainsi les facteurs de croissance tels que le FGF (fibroblastique), l'EGF (épiderme), le HGF (hépatocytaire), le PDGF (plaquettaire) ou encore le VEGF (endothélial vasculaire) ont tous été décrits pour leur induction de SNAILs, ZEBs et/ou TWISTs ainsi que pour leur implication dans la déstabilisation des jonctions cellulaires ou l'induction de protéases.

c. Autres

D'autre part, la signalisation WNT, la voie Notch ou encore l'inflammation (notamment l'interleukine 6) sont également responsables de l'induction de l'EMT, respectivement pour la régulation de la GSK-3 β (voir ci-après) ou l'induction de SNAIL *via* le peptide Notch, ou *via* STAT3 [286].

d. L'hypoxie

L'hypoxie joue un rôle fondamental au cours de la croissance et de la progression tumorale, où elle facilite la néo-vascularisation nécessaire à la croissance tumorale, ainsi que l'échappement et la dissémination métastatique. Il est désormais bien décrit que les effets de l'hypoxie sont médiés par les facteurs de transcription HIFs. Parmi les facteurs de transcription clés de l'EMT (voir ci-après), SNAIL et TWIST sont des cibles des HIFs, et leur expression est induite en conditions hypoxiques. Par ailleurs LOX et LOXL2, deux protéines impliquées dans la régulation de l'expression de SNAIL sont également des cibles induites par l'hypoxie. La stabilisation des HIF α est donc responsable de l'induction de l'EMT, *via* leur action directe ou indirecte sur les facteurs clés de l'induction de cette voie [287-290].

e. Récapitulatif

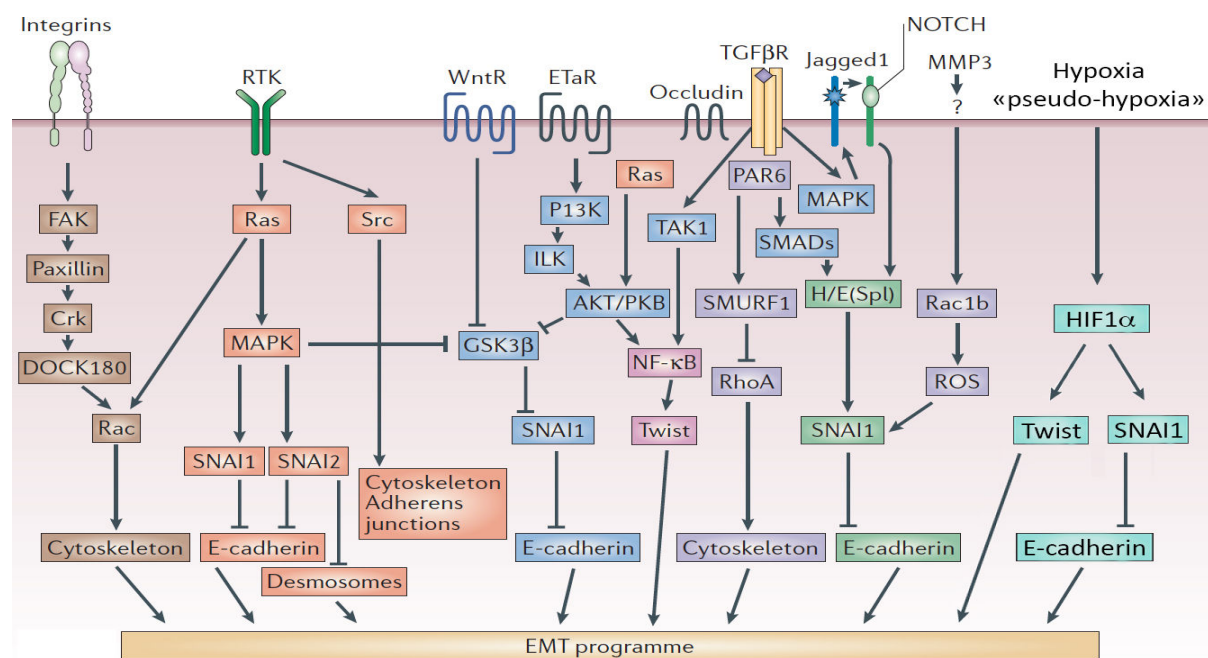


Figure 30 : Les différentes voies de signalisations conduisant à l'induction de l'EMT.

Adapté de Thiery, 2006 [291].

B. Les inducteurs d'EMT

a. *SNAILs*

Sna, homologue de *SNAIL* chez la drosophile, a été mis en évidence en 1991 comme étant impliqué dans la formation du mésoderme chez la mouche [292]. Chez l'Homme trois homologues de Sna sont présents : SNAI1 (SNAIL), SNAI2 (SLUG) et SNAI3. La majorité des études est focalisée sur SNAI1 dont je parlerai principalement par la suite, SLUG et SNAI3 étant moins étudiés.

En 2000, deux études parues simultanément démontrent l'importance de SNAIL au cours de l'EMT pendant la progression tumorale, *via* le contrôle de l'expression de la E-cadhérine [293, 294]. Ces études princeps ont ouvert la voie vers de nombreuses autres, permettant aujourd'hui la compréhension plus précise des rôles et modes d'action de SNAIL au cours de l'EMT.

Structure

Les protéines de la famille SNAIL sont des FT à doigts de zinc (zinc finger, ZF). Elles comportent une région N-terminale (N-ter) variable, au rôle principalement régulateur, et une région C-terminale (C-ter) très conservée, responsable des interactions avec l'ADN (Figure 31).

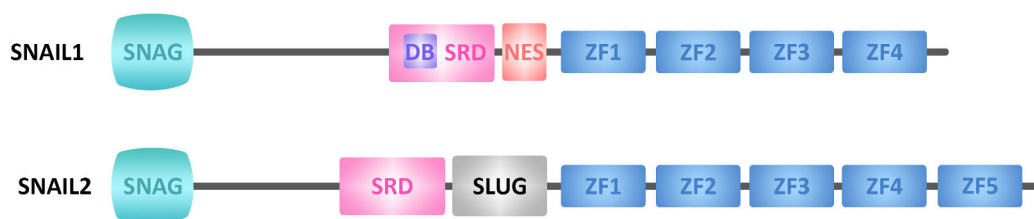


Figure 31 : Comparaison des structures des protéines SNAIL1 et SNAIL2.

DB : boîte de destruction, SRD : domaine riche en sérines, NES : signal d'export nucléaire, ZF : doigt de zinc. Adapté de Peinado et al., 2007 [283].

En N-terminal, on retrouve le domaine SNAG, très conservé et nécessaire à la répression transcriptionnelle des gènes cibles et un domaine riche en sérines et en prolines (le SRD, Serin-Rich Domain) variable, siège de phosphorylations régulatrices (voir ci-après). La protéine SNAIL se caractérise par la présence de deux domaines qui lui sont propres : une boîte de destruction (DB), nécessaire à sa reconnaissance et son ubiquitination par la protéine β TRCP (et son adressage au protéasome), et un signal d'export nucléaire (le NES, Nuclear Export Signal) important pour la localisation de la protéine dans la cellule. SNAI2 est quant à elle caractérisée par son domaine SLUG, impliqué dans le recrutement de corépresseurs, mais qui semble également avoir un rôle dans la modulation négative de l'EMT induite par SNAI2 [295].

La région C-terminale est hautement conservée chez tous les métazoaires, et comporte 4 à 6 ZFs de type C_2H_2 (où C représente une cystéine et H une histidine). Ces structures protéiques courtes (de 30 à 50 aa) sont constituées d'un feuillet β , sur lequel sont exposées les cystéines et d'une hélice α , comportant les deux histidines, délimitant ainsi une « loge » pour l'atome de zinc. Ces motifs présentent une très grande affinité pour les séquences 5' C/A CAGGTG 3' (Ebox) [296-300].

Différentes études se sont par ailleurs intéressées aux signaux d'adressage de SNAIL au noyau. La localisation ainsi que leur nombre des signaux de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal) des protéines SNAIL étaient discutées [301, 302]. Finalement, l'étude la plus récente de Mingot et al. a décrit une séquence NLS dans chacun des trois premiers ZF de SNAIL [303].

Régulation post-traductionnelle

Comme c'est le cas pour de nombreux FT les modifications post-traductionnelles jouent un rôle majeur dans la régulation de SNAIL, pour sa localisation subcellulaire mais aussi pour son activité. C'est l'étude de Dominguez et al. qui, en 2003, a décrit pour la première fois des tailles variables de SNAIL (en Western blot), pouvant correspondre à des différences de phosphorylation. Ils décrivent alors une séquence consensus de NES dans *SNAIL1*, comportant des lysines dont l'état de phosphorylation joue un rôle majeur dans l'interaction avec la protéine CRM1, responsable de l'export nucléaire. Ils décrivent ainsi que la phosphorylation de SNAIL1 est impliquée dans la régulation de sa localisation, fortement corrélée avec sa fonction de FT [298].

Depuis, les études se sont multipliées, et de nombreux résidus aminoacides sont décrits et connus pour leur implication dans la régulation de la localisation de SNAIL, ainsi que sa fonction en tant que répresseur du promoteur de la E-cadhérine (Figure 32).

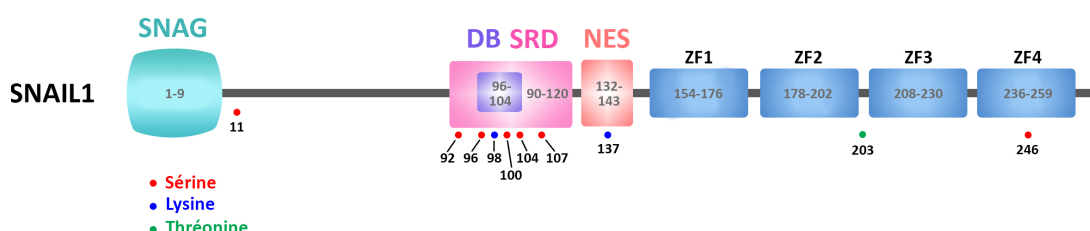


Figure 32 : Localisation des différents résidus modifiables dans la séquence protéique de SNAIL.

Il est établi que les NLS, permettent à SNAIL d'interagir avec les importines α , β , 7 ainsi qu'avec la transportine, qui prennent en charge sa translocation active (dépendante des RanGTP) vers le noyau, où elle sera re-larguée [301-303].

Indépendamment du NLS, d'autres partenaires sont nécessaires pour la translocation nucléaire de SNAIL :

- le transporteur transmembranaire LIV1. Responsable de l'entrée de zinc dans les cellules (inductible par STAT3, les œstrogènes, certains facteurs de croissance ou encore certaines hormones stéroïdiennes) [304], il permet la régulation de la translocation nucléaire de SNAIL, assurant ainsi ses fonctions d'inducteur d'EMT comme cela a été décrit au cours de l'embryogenèse du poisson zèbre [305], et dans un modèle cellulaire humain de carcinome pancréatique [306]. En revanche, et bien que son rôle semble majeur, les mécanismes d'actions médiés par LIV1 pour induire la translocation nucléaire de SNAIL sont toujours inconnus ;
- PAK1, une sérine protéine kinase (notamment impliquée dans la régulation de Rac1 et de Cdc42, deux protéines responsables de la formation des lamellipodes et des filopodes respectivement), est responsable de la phosphorylation d'une sérine en position 246, requise pour l'adressage nucléaire de la protéine [307].

Etant donné la présence double d'un NLS et d'un NES, les protéines SNAIL, une fois transloquées au noyau, peuvent à nouveau être exportées vers le cytoplasme. Il a ainsi été décrit différents

mécanismes et partenaires permettant leur stabilisation nucléaire nécessaire au maintien de leur activité nucléaire :

- les protéines de la famille des lysyl-oxydases (LOX, responsables de la déamination oxydative de résidus peptidiques lysyl), impliquées dans le maintien du rôle de répresseur du promoteur *CDH1* par SNAIL (par interaction directe). La déamination oxydative des lysines 98 et 137 induit un changement conformationnel de SNAIL qui masque un site de phosphorylation par la GSK-3 β (responsable de la dégradation de la protéine, voir ci-après), et favorise le recrutement de corépresseurs transcriptionnels [300, 308] ;
- la kinase p70^{S6K} (effecteur en aval de la PI3K) serait capable d'induire une stabilisation nucléaire de SNAIL et donc le maintien de son activité [309] ;
- les kinases CK2 et la PKA sont responsables de la phosphorylation respective des sérines 92 et 11, nécessaires au maintien dans le compartiment nucléaire [310],
- la kinase Lats2 a été décrite pour son habilité à phosphoryler la thréonine 203 [311].

Enfin, si elle n'est pas stabilisée dans le noyau, SNAIL peut subir des étapes de phosphorylation successives par une sérine/thréonine kinase : la GSK-3 β (kinase de la glycogène-synthétase). Cette enzyme, responsable de la phosphorylation de nombreux FT est capable de reconnaître des séquences consensus de type SxxxSxxxS que l'on retrouve au nombre de deux dans la séquence protéique de SNAIL, séparées par deux prolines (Figure 33) [312].

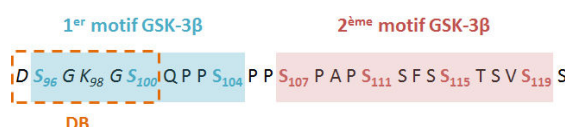


Figure 33 : Localisation des sites de phosphorylation de la GSK-3 β sur les motifs consensus.

Les travaux de Zhou et al. ont permis la description de deux fonctions différentes pour ces motifs. La phosphorylation du 2^{ème} motif (sur la sérine 107) a lieu dans le noyau et induit l'export de la protéine vers le cytoplasme. La phosphorylation du 1^{er} motif (sur les sérines 96, 100 ou 104) qui permet la reconnaissance et l'ubiquitination par la protéine β TRCP, conduit à sa dégradation dans le protéasome 26S (le domaine de destruction au motif consensus DSGxxS, se superposant avec le 1^{er} motif) [299]. La phosphorylation par la GSK-3 β semble néanmoins réversible, via la SCP, une phosphatase spécifique de SNAIL, capable de déphosphoryler les deux motifs cibles de la GSK-3 β [313]. Il est également intéressant de noter qu'il existerait une voie de dégradation de SNAIL, indépendante de la phosphorylation par la GSK-3 β avec notamment l'ubiquitine ligase FBXL14 [314]. Les travaux de Du et al. ont par ailleurs permis la description de la sérine 11 comme une cible de la protéine kinase PKD1. La phosphorylation de SNAIL sur ce résidu entraîne son export vers le cytoplasme après interaction avec la protéine 14-3-3 σ [315].

Enfin il a également été décrit, dans un contexte inflammatoire, une stabilisation de SNAIL par le NF κ B (induit par les cytokines inflammatoires comme le TNF α), qui serait capable d'induire le signalosome COP9 (CSN2), responsable de l'inhibition de l'ubiquitination de SNAIL et donc ainsi de sa stabilisation [316].

SNAIL est une protéine labile, dont la demi-vie est courte (environ 25 minutes). Les modifications post-traductionnelles sont donc essentielles pour maintenir son expression et la protéger de la dégradation pour qu'elle puisse agir comme inducteur d'EMT. Les options de modifications sont

multiples, mais n'ont pas lieu simultanément dans la cellule. L'activité de SNAIL dépend ainsi de la présence et de l'équilibre des différents partenaires capables de moduler sa séquence protéique et donc son activité.

En ce qui concerne les modifications de SLUG, l'étude de Kim et al. a montré qu'un motif consensus pour la GSK-3 β était présent dans le domaine SLUG de SNAIL2, et que sa phosphorylation était importante pour la régulation de la stabilité et de la demi-vie de la protéine [317]. D'autre part, il a été décrit que SLUG pouvait être ubiquitiné par MDM2, en formant un complexe avec p53. L'absence de protéine p53 fonctionnelle serait donc en faveur d'une stabilité de SLUG [318].

b. ZEBs

La famille ZEB comporte deux membres : les facteurs ZEB1 (ou δ EF1) et ZEB2 (ou SIP1), initialement décrits pour leur implication dans le développement du SNC (fermeture du tube neural), du cœur, des muscles squelettiques et des cellules hématopoïétiques (surtout la lignée de cellules T) [319]. Ces FT sont également des inducteurs d'EMT au cours de la progression tumorale [320, 321].

Structure

Les facteurs ZEBs sont caractérisés par la présence de deux groupes de ZF, situés à chaque extrémité de l'homéodomaine central (HD, de structure proche des domaines POU) responsables des interactions protéine/protéine. Ces trois régions sont celles qui présentent le plus d'homologie entre les deux protéines (Figure 34).

En N-ter et en C-ter, on retrouve 3 ZF de type C₂H₂, auxquels s'ajoute un ZF de type C₃H en N-ter. Ils sont capables de se lier à l'ADN au niveau de Ebox bipartites de type 5' CACCTG 3' et 5' CACCTG 3'. Les facteurs ZEBs sont induits par le TGF β , ils possèdent donc un domaine d'interaction avec les protéines SMAD, le SDB [322]. Enfin, pour assurer leurs fonctions d'activateurs et de répresseurs transcriptionnels, les ZEBs disposent de séquences d'interactions avec des co-activateurs et des corépresseurs. Ainsi, le domaine d'interaction avec CtBP (CID) assure le recrutement de corépresseurs, alors que l'on retrouve en N-ter, en amont des ZFs une région d'interaction avec les co-activateurs p300 et P/CAF [319].

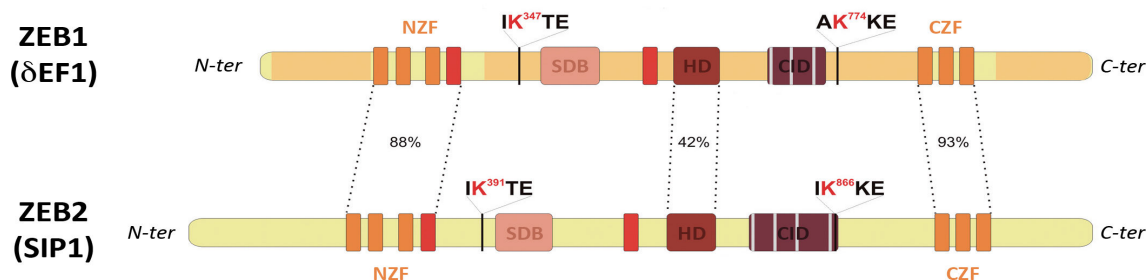


Figure 34 : Représentation des structures des protéines ZEB1 et ZEB2 et de leurs domaines protéiques

NZF : ZF en N-ter, CZF : ZF en C-ter, SDB : Domaine d'interaction avec les protéines Smad, CID : domaine d'interaction avec CtBP. D'après Vandewalle, 2009 [323].

Régulation post-traductionnelle

Peu d'études ont cependant été menées concernant les modifications post-traductionnelles des ZEBs. En effet, peu de sites de modifications sont connus, et leurs fonctions restent équivoques. ZEB1 présente par exemple une forme phosphorylée dans la plupart des cellules, mais on ignore quel(s) résidu(s) est (sont) impliqué(s), ainsi que sa (ses) fonction(s), les deux formes étant nucléaires [324].

L'étude de Long et al. a permis la mise en évidence d'un phénomène de sumoylation des protéines ZEB1 et ZEB2, sur deux résidus très conservés : les lysines 347 et 774 (et leurs homologues 391 et 866 dans la séquence de ZEB2), par la protéine Pc2 (une SUMO-E3 ligase). Sans effet sur la localisation subcellulaire des protéines, cette sumoylation est cependant responsable de l'augmentation de l'interaction avec la protéine CtBP (co-activateur de ZEB), et conduit à une diminution des effets répresseurs, notamment ceux observés sur l'activité du promoteur de *CDH1* [325].

Il a par ailleurs été décrit que l'acétylation de CtBP (par la protéine p300 nucléaire) au niveau de la lysine 10 serait responsable de la modulation de sa localisation nucléaire et donc de l'activité répressive des ZEBs, qui nécessite une interaction avec ce corépresseur [326].

c. *bHLHs*

Les protéines de type bHLH, dont le nom provient de leur structure (voir ci-après) sont des FT, qui fonctionnent sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères pour réguler la spécification et la différenciation cellulaire. Elles sont classées en différents groupes selon leur distribution tissulaire et leur dimérisation, les molécules de classe I formant des dimères avec celles de classe II. Ainsi parmi les protéines bHLH impliquées dans l'EMT, E12/E47 (TCF3) et E2.2 (TCF4) (molécules de classes I) peuvent former des dimères avec TWIST1 et TWIST2 (molécules de classe II). Les protéines Ids (inhibiteurs de différenciation) ne sont en revanche pas capables de se lier à l'ADN, et ne forment pas de dimères [283, 286].

Structure

Les protéines bHLH comportent un domaine basique (b) de liaison à l'ADN et deux hélices α antiparallèles, reliées par une boucle (hélice-boucle-hélice), nécessaire à leur dimérisation (Figure 35). D'autres domaines comme le domaine PAS, retrouvé dans la structure des HIFs, ou le domaine « leucine-zipper », retrouvé dans la structure de MYC, existent mais ne sont pas propres à toutes les protéines bHLH. Le dimère bHLH interagit avec l'ADN, et permet la reconnaissance spécifique des éléments de type Ebox [283].

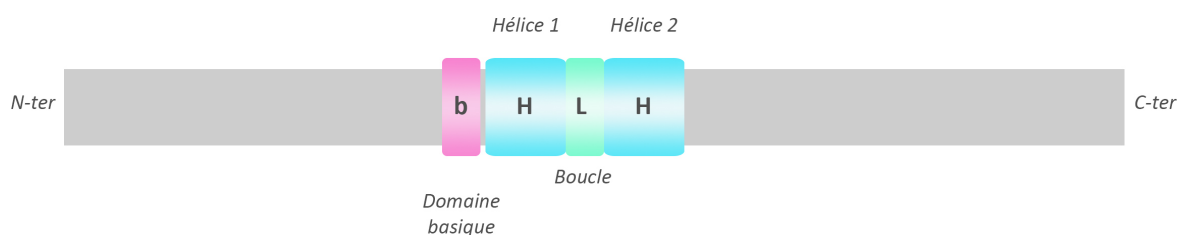


Figure 35 : Représentation de la structure des protéines bHLH

Régulation post-traductionnelle

Il existe peu de données sur les modifications post-traductionnelles des protéines bHLH impliquées dans l'EMT, et seule l'étude de Hong et al. a permis de mettre en évidence une phosphorylation de la protéine TWIST, sur une sérine en position 68. Cette phosphorylation médiée par les MAP Kinases p38, JNK et ERK n'a pas d'impact sur la localisation subcellulaire de la protéine, ni sur ses capacités de dimérisation. En revanche elle protège la protéine de la poly-ubiquitination et donc de sa dégradation, ce qui se traduit par une augmentation de sa demi-vie [327].

C. Modes d'actions

Les FT inducteurs d'EMT sont surtout décrits pour leurs rôles de répresseurs transcriptionnels. Ce sont donc les mécanismes liés à ces fonctions qui sont les plus clairement décrits. Globalement, les FT agissent *via* le recrutement de corépresseurs, et/ou de complexes multi-protéiques responsables d'une modification de la chromatine et de son accessibilité pour la transcription. Chaque FT possède ses propres spécificités d'interaction, et donc de recrutement.

a. SNAILs

Les deux études princeps de Cano et Batlle (parues simultanément en 2001) ont permis la description du rôle direct de SNAIL dans la répression du gène *CDH1*.

Cano et al. ont démontré que SNAIL était capable d'induire une répression directe et quasi complète du gène *CDH1* (jusqu'à 95%) *via* sa fixation aux éléments Ebox très conservés du promoteur proximal. Ils observent par ailleurs une corrélation entre l'expression de *SNAIL1* et la perte d'expression de E-cadhérine, associée à une modification de la morphologie cellulaire, une augmentation des capacités migratoires et invasives des cellules *in vitro*, une induction des marqueurs mésenchymateux, et une induction de la tumorigénicité *in vivo*, sans effet sur la prolifération des cellules [294]. Batlle et al. ont observé cette même anti-corrélation d'expression de SNAIL et de E-cadhérine, associée à la perte des jonctions adhérentes médiées par la E-cadhérine. Ils décrivent une très forte conservation des séquences Ebox entre l'Homme et la souris, et démontrèrent le rôle de SNAIL sur l'activité du promoteur de *CDH1*, dont l'activité est réduite en présence de SNAIL [293].

Depuis, différents mécanismes de répression transcriptionnelle de *CDH1* ont été décrits. Cette répression SNAIL-dépendante peut en effet être due à :

- une diminution de l'acétylation des histones H3 et H4 et une augmentation de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), médiée par le recrutement direct par SNAIL des histones désacétylases HDAC1, HDAC2 et de l'ADN méthyltransférase DNMT, ainsi qu'au recrutement de corépresseurs transcriptionnels comme mSin3a [328] ;
- une méthylation de l'ADN médiée par l'interaction SNAIL/G9a, responsable de la méthylation des histones (H3K9) et le recrutement de DNMT1, 3A et 3B [329]. Ce mécanisme est d'ailleurs équivalent à celui décrit lors de la répression des gènes responsables de la pluripotence [330] ;
- un recrutement des protéines SUZ12 et EZH2 du complexe Polycomb-repressive complex PRC2, responsables de la triméthylation des lysines H3K27 [331], et du maintien de la chromatine dans une structure incompatible avec la transcription *via* HDAC1 et HDAC2 [332];

- un recrutement de l'histone méthylase LSD1, responsable de la déméthylation des histones H3K4 (associée à une chromatine active) [333].

b. ZEBs

Les facteurs ZEBs sont capables de réprimer la transcription grâce au recrutement de corépresseurs. L'étude de Wang et al. en 2007 a décrit l'importance du corépresseur CtBP dans ce mécanisme. En effet CtBP fait partie d'un important complexe multi-protéique impliqué dans la répression génique. Son interaction avec ZEB permet notamment le recrutement, au niveau des promoteurs cibles, de la protéine LSD1 (déméthylation H3K4 et H3K9), mais aussi des protéines CoREST et HDACs (désacétylation des histones) [334].

La mise en évidence de l'interaction de ZEB1 et de BRG1, l'une des sous-unités à activité ATPase du complexe protéique SWI/SNF, impliquée dans le remodelage de la chromatine, a par ailleurs permis la description du mécanisme d'inhibition de *CDH1* dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, [335].

c. bHLHs

Parmi les bHLHs, c'est pour les facteurs TWISTs qu'il existe le plus de données dans la littérature permettant d'expliquer la répression des marqueurs épithéliaux (notamment la E-cadhérine) ainsi que l'induction de marques mésenchymateuses.

Parmi les partenaires de la répression médiée par TWIST on retrouve ainsi :

- BMI1, une protéine du complexe répresseur PRC1 responsable du recrutement de PRC2 (qui comprend l'enzyme EZH2, une méthyltransférase responsable de la méthylation de H3K27) [336] ;
- SET8, une méthyltransférase de H4K20 notamment responsable de l'inhibition de la transcription de *CDH1*, mais aussi de *TP53* [337] ;
- le complexe Mi2/NuRD, recruté par les dimères TWIST/TCF3 *via* l'interaction avec les protéines MTA2, HDAC2, et RbAp46. Ce complexe est impliqué dans la désacétylation des histones, et dans le remodelage ATP-dépendant de la chromatine [338].

De façon intéressante, l'interaction de TWIST avec BMI1, mise en évidence par Yang et al., a permis de démontrer que la reconnaissance d'Ebox, et la méthylation de H3K27 médiée par EZH2, étaient associées à la répression transcriptionnelle, lorsque les Ebox sont situées dans le promoteur proximal des gènes (comme pour *CDH1*) mais aussi lorsqu'elles sont situées dans d'autres régions du gène (comme l'exon 1 du gène *INK4A*, codant pour la protéine p16). Ces données confirment par ailleurs l'inhibition de p16 par TWIST, et donc l'inhibition de la sénescence décrite par Ansieau et al. [339].

d. Bilan

La répression génique médiée par les FT inducteurs d'EMT se fait donc *via* le recrutement de régulateurs épigénétiques divers, dont les actions convergent vers la condensation de la chromatine, et la répression transcriptionnelle. Très schématiquement, le recrutement au niveau de la chromatine de complexes multi-protéiques répresseurs du type Polycomb (PRC) (Figure 36a), NuRD (Figure 36b) ou de LSD1 (Figure 36c) assure respectivement la méthylation de H3K27, la désacétylation de H3K9/14, et la déméthylation de H3K4, responsables de la répression

transcriptionnelle. La méthylation de H3K9 par G9a assure la mobilisation des DNMTs, les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG également responsables de la structure inactive de la chromatine non-compatible avec la transcription (Figure 36d).

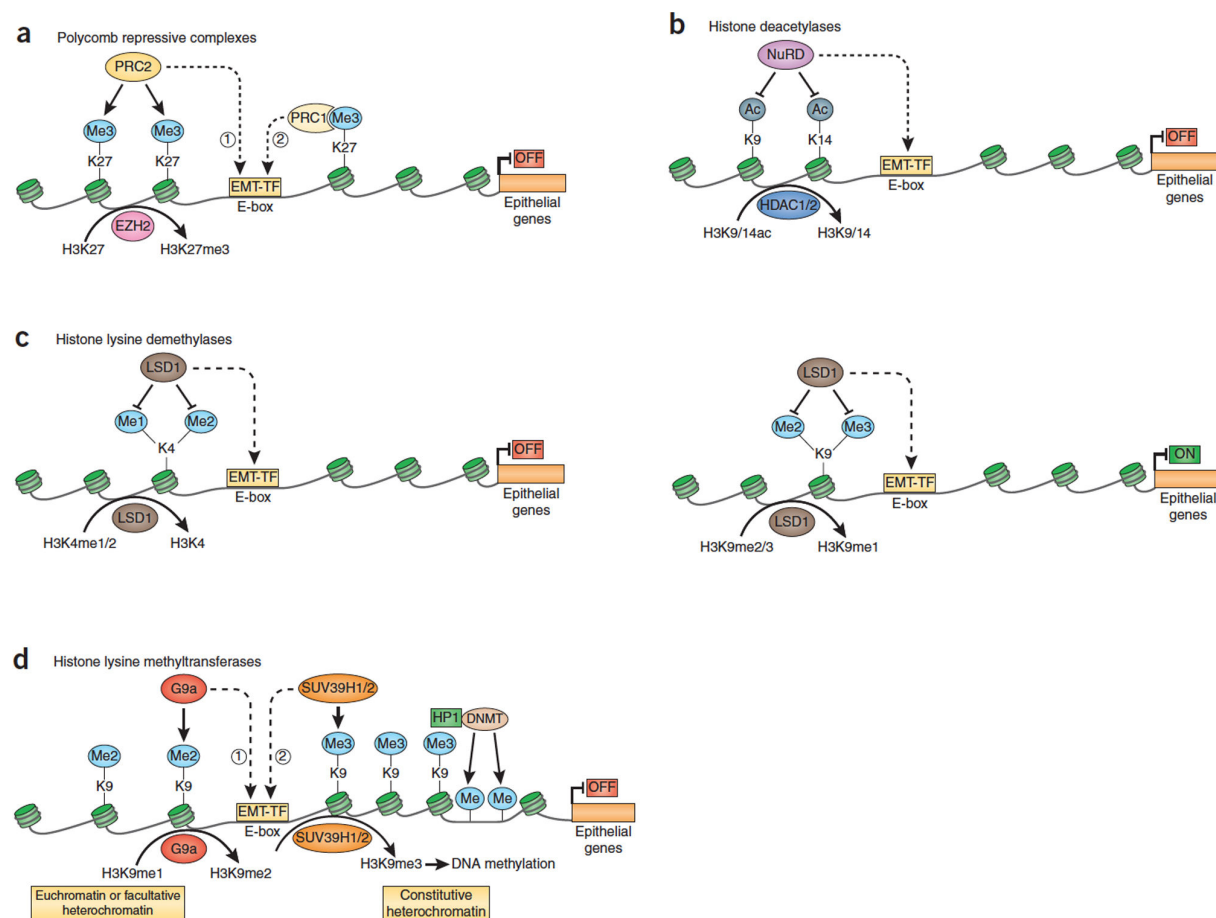


Figure 36 : Schématisation de la structure de la chromatine en fonction des modifications des histones et/ou de l'ADN. D'après Tam, 2013 [340].

Inducteurs d'EMT	Interactions protéiques décrites	Conséquences	Référence
SNAILS	- SUZ12, EZH2 (PRC2) - G9a (DNMT1, 3A, 3B) - mSin3a, HDAC 1&2 - LSD1	- Triméthylation H3K27 - Méthylation îlots CpG - Désacétylation H3K9 - Déméthylation H3K4, H3K9	[328, 329, 331-333]
ZEBs	- LSD1 (CtBP) - BRG1 (SWI/SNF)	- Déméthylation H3K4, H3K9 - Remodelage de la chromatine	[334, 335]
bHLHs	- BMI1 (PRC1) - EZH2 (PRC2) - SET8 - Mi2/NuRD (MTA2, HDAC2, RbAp46)	- Triméthylation H3K27 - Monométhylation H4K20 - Désacétylation histones	[336-338]

Table 14 : Récapitulatif des complexes répresseurs recrutés par les inducteurs d'EMT

D. Les différentes cibles des FT clés de l'EMT

Au-delà de leur activité répressive du gène *CDH1*, qui a permis leur mise en évidence comme FT au rôle majeur d'inducteur d'EMT, ainsi que la description de leur(s) mode(s) de d'action, les facteurs

SNAILs, ZEBs et bHLHs se sont révélés avoir de multiples cibles. Ils sont ainsi décrits comme impliqués dans le programme de dédifférenciation épithéliale qui a lieu au cours de l'EMT pour leurs rôles inhibiteurs de nombreux gènes codant pour des marques épithéliales. L'étude de De Craene et al. a permis la mise en évidence de l'importance de ces FT et notamment de SNAIL, en démontrant qu'il pouvait induire la répression de près de 167 gènes impliqués dans la différenciation épithéliale, le métabolisme et la transduction de signal, et dans l'induction de 23 gènes [341].

Ces FT se sont également révélés capables d'induire l'expression de gènes impliqués dans l'acquisition de marques mésenchymateuses. Par ailleurs, ces FT sont également décrits pour leur rôle dans la protection cellulaire contre la mort cellulaire programmée et dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. On retrouve notamment l'inhibition de cyclines D1 et D2, impliquées dans la transition G1/S du cycle cellulaire (Figure 37). L'induction de l'EMT associe donc l'acquisition de propriétés migratoires et invasives, à une prolifération cellulaire réduite et à une résistance à l'apoptose [283, 286, 294, 319, 320, 322, 341-347].

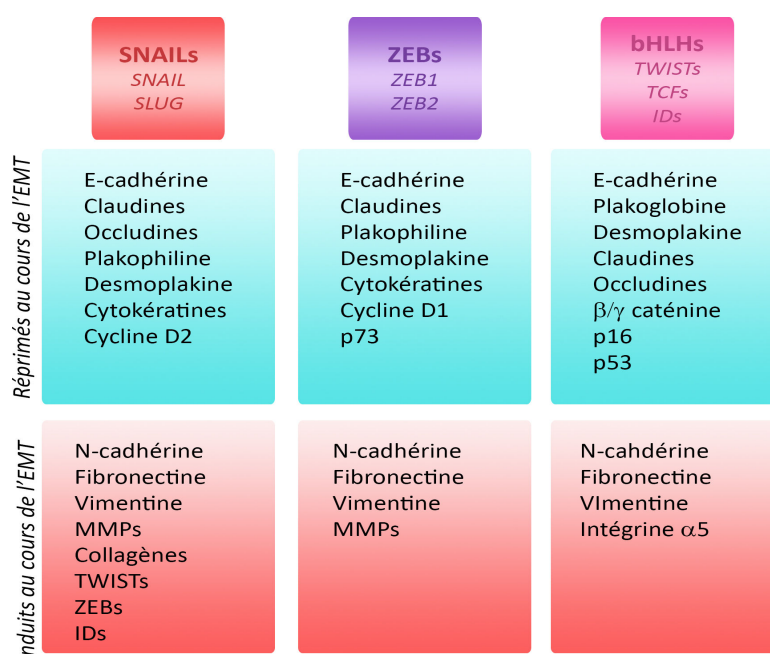


Figure 37 : Les différentes cibles réprimées et induites au cours de l'EMT

E. Importance en cancérologie

L'EMT est synonyme de dissémination métastatique au cours de la progression tumorale, et la surexpression ou l'induction de SNAILs, ZEBs ou de protéines bHLH (TWISTs et TCFs) sont des marqueurs utilisés pour prédire le caractère invasif des tumeurs. De nombreuses études permettent aujourd'hui d'établir dans de multiples types de cancer, une corrélation entre ces FT et des critères clinico-biologiques tels que : l'apparition de métastases (notamment ganglionnaires), le stade tumoral (généralement avancé) de la maladie, la survie globale des patients ou encore la survie sans progression (Table 15).

Inducteurs d'EMT	Types de tumeurs ou cancers associés			Références
SNAILs	- Sein,	- Colon,	- Corticosurrénale,	[309, 348-357]
	- Ovaires,	- Vessie,	- Œsophage,	
	- Estomac,	- Pharynx,		
	- Thyroïde,	- Foie,		
ZEBs	- Prostate,	- Vessie,		[283, 319]
	- Endomètre,	- Ovaires,		
	- Poumons,	- Estomac,		
	- Colon,	- Pancréas		
bHLHs	- Sein,	- Poumons,	- Estomac,	[283, 339, 342, 343]
	- Colon,	- Peau,	- Foie,	
	- Vessie,	- Pancréas	- Ovaires,	
	- Œsophage,	- Prostate,		

Table 15 : Implication des facteurs SNAILs, ZEBs et bHLHs en cancérologie

F. Modifications cellulaires et conséquences fonctionnelles secondaires à l'EMT

L'EMT induit un changement phénotypique important dans les cellules, qui ne présentent plus les mêmes types de jonctions entre elles, suite à la perte d'expression des protéines impliquées dans la formation de ces dernières. Leur morphologie est différente, ce qui est le reflet d'une réorganisation du cytosquelette. Elles acquièrent des propriétés invasives et migratoires importantes, synonymes d'interactions différentes avec la matrice extracellulaire.

Toutes ces modifications cellulaires ont pour conséquence une très forte habilité des cellules cancéreuses ayant subi une EMT à réaliser toutes les étapes nécessaires à la dissémination métastatique et à la colonisation d'organes secondaires (Figure 38).

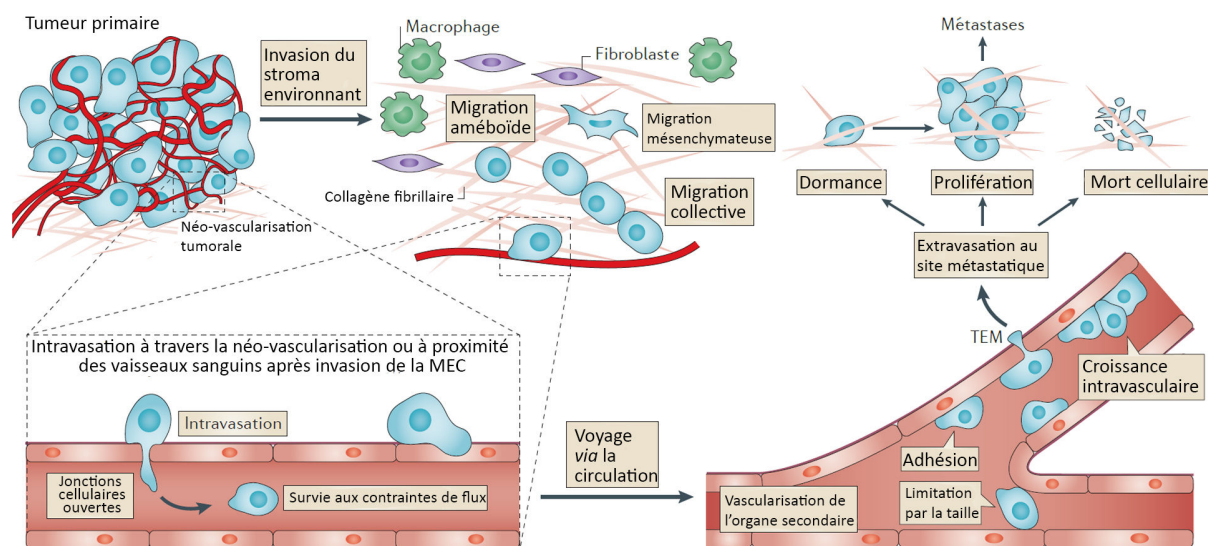


Figure 38 : Les différentes étapes de la dissémination métastatique.

Les cellules ayant subi une EMT sont capables de migration et d'invasion, elles doivent ensuite passer à travers la paroi des vaisseaux pour rejoindre la circulation et le site métastatique, après adhésion et extravasation. Adapté de Reymond et al., 2013 [358].

a. *Jonctions cellulaires*

L'intégrité tissulaire des épithéliums est maintenue par les jonctions épithéliales qui peuvent être adhérentes, serrées, communicantes ou des desmosomes (Figure 39). En plus de leur rôle essentiel dans l'adhésion des cellules entre elles, elles assurent également la polarité apico-basale. Au cours des premières étapes de l'EMT ces jonctions vont être séquentiellement perdues, suite à la relocalisation ou à la dégradation des protéines. La stabilisation de la répression des gènes épithéliaux conduit ensuite à leur perte, qui reflète une EMT complète [286, 359].

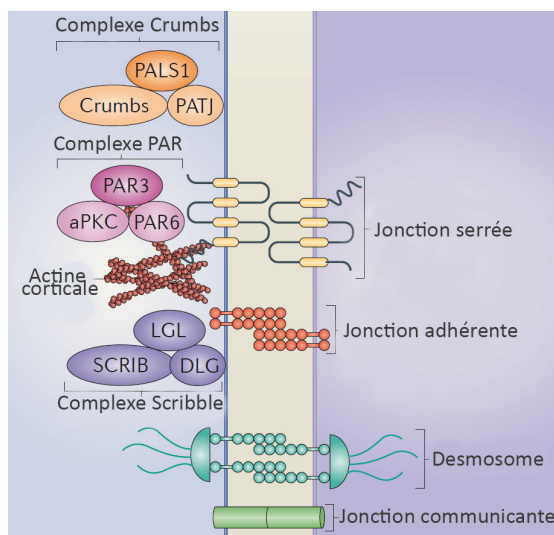


Figure 39 : Représentation des différents types de jonctions cellulaires existants entre cellules épithéliales.

D'après Lamouille et al. 2014 [286].

Les jonctions serrées, sont chronologiquement établies en dernier. Elles sont constituées de claudines et d'occludines entièrement transmembranaires, en interaction avec les protéines ZO1, 2 et 3. Elles permettent l'établissement de jonctions entre les cellules épithéliales mais également entre les cellules endothéliales. Elles interagissent avec les complexes de polarité Crumbs et PAR, ce qui définit le pôle apical des cellules, et sont reliées au cytosquelette d'actine.

Les jonctions adhérentes sont constituées de molécules d'adhésion transmembranaires (les cadhérines), et de protéines de la famille Armadillo. La E-cadhérine est spécifique des cellules épithéliales et induit l'adhésion entre deux cellules *via* son domaine extracellulaire. Son domaine cytoplasmique lui permet d'interagir avec la β -caténine et avec p120, qui sont elles-mêmes en contact avec le cytosquelette d'actine. Ces jonctions sont en interaction avec le complexe de polarité SCRIB/DLG/LGL, qui définit le pôle baso-latéral des cellules.

Les desmosomes, comme les jonctions adhérentes, sont constituées de cadhérines en interaction avec des protéines Armadillo. Les cadhérines desmosomales sont la desmoglérine et la desmocolline, elles sont associées à la plakoglobine et à la plakophiline, et sont en connexion avec le cytosquelette de filament de cytokératines *via* la desmoplakine. Les jonctions adhérentes et les desmosomes sont par ailleurs capables d'interactions qui renforcent l'adhésion cellulaire. Les intégrines et les hémidesmosomes sont par ailleurs mis en place dans les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire.

Enfin les jonctions communicantes, composées d'hexamères de connexine, ont principalement un rôle dans les échanges ioniques, mais participent également à l'adhésion entre les cellules [286, 359].

Les jonctions cellulaires sont des structures dynamiques, en constant renouvellement par le biais d'endocytose, de recyclage et de dégradation des cadhérines après phosphorylation et ubiquitination (par Src pour la E-cadhérine, ou PKC α pour la desmoplakine). Ces modifications post-traductionnelles, au cours de l'EMT sont responsables de la perte de l'adhésion entre les cellules, et entre les cellules et la MEC, ce qui est favorable à leur migration [360, 361].

b. *Remodelage du cytosquelette*

La perte des jonctions cellulaires a des répercussions sur le cytosquelette, qui subit un important remodelage, au niveau des filaments d'actine directement en contact avec ces jonctions.

Le cytosquelette d'actine est une structure dynamique en constant renouvellement. Dans un contexte d'EMT, la perte des jonctions cellulaires induit une réorganisation complète de cette structure, pour permettre l'élongation des cellules, et leur motilité directionnelle. Les structures statiques d'actine vont être remplacées par des structures de type lamellipodes/filopodes ou invadopodes associées à la motilité et à l'invasion cellulaire. Les lamellipodes sont les principales organelles de la locomotion cellulaire en deux dimensions. Ils sont très riches en actine non ramifiée, et assurent les interactions et l'attachement au microenvironnement *via* des molécules d'adhésion comme les cadhérines ou les intégrines. Les filopodes sont des structures plus rondes, constituées de fibres d'actine plus compactées. Ils sont impliqués dans la détection des signaux chimio-attractant et des nutriments. Ils sont interconnectés et inter-convertibles avec les lamellipodes. Les invadopodes, sont l'équivalent des podosomes dans les cellules transformées et présentent en plus une activité protéolytique pour la dégradation de la MEC. Ces structures hybrides entre le filopode et le lamellipode sont très riche en actine, en protéases de type MMPs, et en intégrines. Les intégrines, qui constituent les récepteurs nécessaires à l'interaction avec les protéines de la MEC (laminine, collagène et fibronectine) sont spécialisées dans la migration et l'invasion en trois dimensions [362].

Les microfilaments de cytokératines assurent quant à eux l'intégrité structurale des desmosomes, en inhibant la phosphorylation des desmoplakines par la PKC α . En leur absence, la stabilité des desmosomes n'est donc pas assurée [360].

c. *Activité protéolytique*

En absence de jonctions cellulaires, les cellules peuvent adopter deux types de mouvement individuel, la migration améboïde ou la migration mésenchymateuse. La migration améboïde est adoptée par des cellules de forme arrondie. Elle est indépendante de toute activité protéolytique, les cellules se déplaçant dans les pores existants dans la matrice. La migration mésenchymateuse est le mode de migration des cellules allongées (de type fibroblastique), et nécessite une activité de protéolyse. Lorsque les jonctions cellulaires sont toujours présentes, les cellules optent pour une migration collective [361].

L'activité protéolytique cellulaire est médiée par les MMPs, qui sont des endopeptidases au rôle majeur dans la dégradation et le remodelage des protéines de la MEC, mais aussi des molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules. Avec les cathepsines, elles assurent ainsi la régulation de la migration et de l'invasion cellulaire. Synthétisées sous une forme inactive (possédant un pro-

peptide), les MMPs requièrent une étape de clivage activateur, qui peut s'effectuer de façon intracellulaire (par la furine) ou extracellulaire (par le biais de sérine protéases comme la plasmine, ou *via* d'autres MMPs). Leur action est par ailleurs modulée par l'équilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs (les TIMPs). De manière particulièrement intéressante, bien qu'elles aient été longtemps considérées uniquement pour leur implication dans la dégradation de la MEC, les MMPs sont aujourd'hui décrites pour de multiples fonctions. Elles ont ainsi un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse tumorale, par leur habilité à cliver des pro-peptides angiogéniques, mais aussi une action anti-apoptotique *via* le clivage des ligands FAS (signal cellulaire inducteur d'apoptose) [363].

3. Le processus de MET et la formation de macro-métastases

L'EMT est un processus permettant aux cellules d'acquérir des propriétés migratoires et invasives importantes, qui est cependant associé à l'inhibition des propriétés prolifératives des cellules. Les cellules subissant une EMT sont donc capables de dissémination : migration et invasion locales, intravasation, extravasation et implantation à distance. Cependant elles ne disposent plus de capacités prolifératives, on parle alors de micrométastases indétectables. Il est donc nécessaire que les inducteurs d'EMT qui ont été activés pour permettre la dissémination de ces cellules soient réprimés, afin que les cellules retrouvent des caractéristiques épithéliales et des capacités prolifératives, afin de former des macro-métastases (Figure 40). On parle alors de réversion de l'EMT ou de MET.

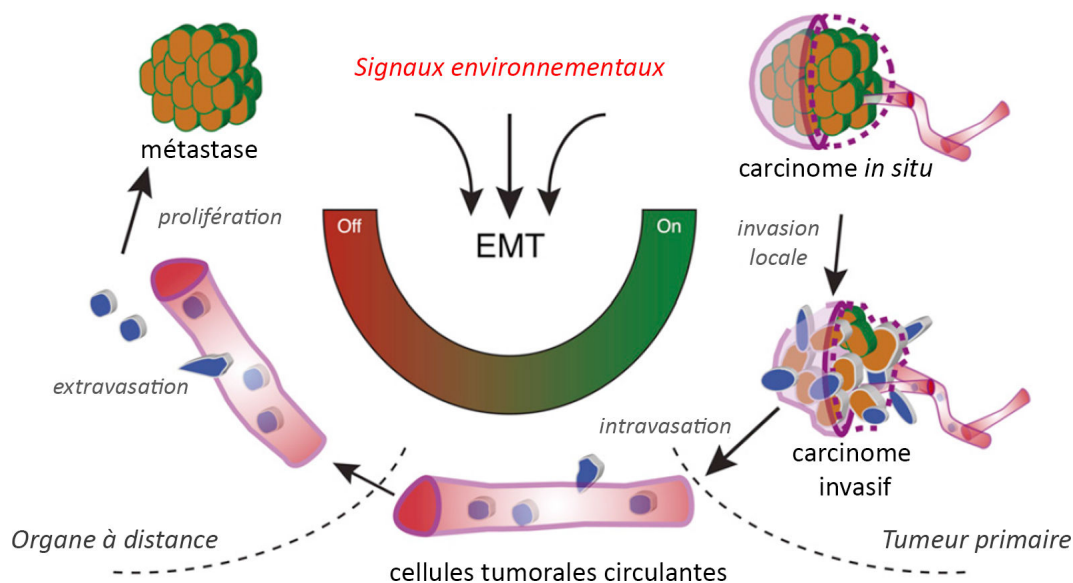


Figure 40 : Représentation schématique du modèle réversible d'EMT, et du rôle de la MET dans le développement de macro-métastases. D'après Tsai et al., 2012 [364].

En effet, comme l'ont montré Tsai et al. dans un modèle d'induction réversible de TWIST, ce FT est indispensable pour l'induction complète d'un phénomène d'EMT (perte des interactions cellulaires, expression des marqueurs mésenchymateux, intravasation, extravasation et invasion locale). De façon très intéressante, ils ont démontré que la perte de TWIST était ensuite nécessaire pour que les cellules deviennent alors capables de proliférer et de former des macro-métastases [364].

De la même façon, PRRX1, un facteur de transcription (exprimé dans les cellules mésodermiques n'exprimant ni SNAI1, ni SNAI2) induit par le TGF β , et capable d'induction d'EMT, a été décrit comme requis pour l'acquisition des caractéristiques mésenchymateuses, de la migration et de l'invasion cellulaire. En revanche, sa perte est nécessaire pour la réversion de l'EMT, le ré-établissement des caractéristiques épithéliales et des capacités de colonisation et de prolifération. Son faible niveau d'expression a ainsi été corrélé avec une réduction de la survie sans progression chez les patients atteints de tumeurs mammaires et pulmonaires [365].

Par ailleurs, et comme cela est suggéré par Carstens et al., la MET aurait lieu dans les sites métastatiques en réponse à l'absence des signaux environnementaux initialement inducteurs d'EMT au site de la tumeur primaire. C'est notamment le cas pour l'EMT induite par l'interleukine 6, une cytokine produite par les cellules immunitaires au site d'initiation tumorale. Après dissémination, les cellules métastatiques se retrouvent dans un stroma différent, où les signaux environnementaux ne sont plus les mêmes, favorisant ainsi le retour vers un phénotype épithélial, prolifératif [366].

OBJECTIFS ET PRÉSENTATION DE CE TRAVAIL DE THÈSE

Suite aux différentes découvertes cliniques et génétiques, effectuées notamment PAR mon équipe d'accueil, sur le lien entre mutations du gène *SDHB* et phénotype métastatique des PCC/PGL, les objectifs de mon travail de thèse étaient :

- (1) d'identifier une voie moléculaire permettant d'expliquer le haut potentiel métastatique associé aux mutations du gène *SDHB* ;
- (2) de comprendre les particularités de la tumorigenèse *SDHB*-dépendante, ainsi que ses modes de régulation ;
- (3) d'utiliser un modèle cellulaire innovant de PCC/PGL reproduisant une inactivation du gène *SDHB* afin d'étudier plus précisément les mécanismes de tumorigenèse et le rôle des différents acteurs impliqués.

L'ensemble de mes travaux de recherche a ainsi porté sur l'étude, l'implication et les possibles modes de régulation de la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les PCC/PGL porteurs de mutations sur le gène *SDHB*.

Dans un premier temps, à l'aide de données transcriptomiques collectées à partir d'échantillons tumoraux humains, je me suis intéressée à la description de l'activation de la voie de l'EMT, dans un sous-groupe de tumeurs de notre collection. J'ai ainsi pu montrer pour la première fois que seuls les échantillons *SDHB*-malins présentaient une activation transcriptionnelle de cette voie. Par ailleurs, sur des coupes de tissus, j'ai pu mettre en évidence une rétention nucléaire de SNAIL, un facteur de transcription clé de l'EMT dans ces mêmes tumeurs.

Ces résultats nous ont permis de valider notre hypothèse de l'activation de l'EMT dans les tumeurs *SDHB*-malignes, et ont donné lieu à la publication d'un article dont je suis le premier auteur, dans la revue *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* en 2012.

Dans un deuxième temps, à partir cette fois des données globales de méthylation, collectées sur les mêmes échantillons tumoraux, nous avons mis en évidence que les tumeurs porteuses de mutations sur les gènes *SDHx* étaient caractérisées par un phénotype dit « hyperméthylateur », défini par une hyperméthylation globale de l'ADN. De façon intéressante, l'un des gènes les plus hyperméthylés (*KRT19*) est impliqué dans le processus d'EMT, et présente une hyperméthylation plus importante dans les tumeurs *SDHB*-mutées que dans les autres tumeurs *SDHx*.

Par ailleurs, dans le premier modèle d'inactivation complète du gène *Sdhb* dans des cellules chromaffines, développé au laboratoire, nous avons observé l'existence de ce même phénotype hyperméthylateur et démontré qu'il était dû à une inactivation des enzymes responsables de la déméthylation de l'ADN et des histones (TETs et KDMs). Enfin, nous avons mis en évidence une implication de la méthylation dans la régulation des propriétés migratoires des cellules.

Ces résultats nous ont donc permis de décrire le phénotype hyperméthylateur caractéristique des tumeurs *SDHx*, et de mettre en évidence que la méthylation pouvait être un mode de régulation de gènes impliqués dans le processus d'EMT spécifique de l'inactivation du gène *SDHB*. Ces données ont conduit à la publication d'un article dont je suis le second auteur, dans la revue *Cancer Cell* en 2013.

Enfin, dans un dernier temps, je me suis intéressée à la caractérisation de l'EMT dans ce nouveau modèle cellulaire, en étudiant l'activation transcriptionnelle et protéique de la voie, mais également les propriétés migratoires, invasives et adhésives des cellules. J'ai par la suite focalisé mon étude sur *KRT19*, un gène associé à l'EMT, fortement méthylé et réprimé dans les tumeurs *SDHB*-malignes et dans les cellules. J'ai ainsi pu montrer l'implication de la kératine 19 *in vitro* et *in vivo* dans l'acquisition des caractéristiques métastatiques des cellules *Sdhb*^{-/-}.

Ces résultats nous ont permis de valider, moléculairement et fonctionnellement, l'activation de l'EMT dans un modèle cellulaire *Sdhb*^{-/-}, et de décrire l'implication de l'acteur important qu'est la kératine 19. Ces données nous ont amené à écrire un article actuellement en préparation, et dont je suis le premier auteur.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. ACTIVATION DE L'EMT DANS LES PCC/PGL *SDHB*-MALINS

1. Travaux antérieurs : L'EMT et la malignité des PCC/PGL

En 2009, deux études ont mis en relation l'agressivité des PCC/PGL avec une augmentation d'expression de deux des principaux facteurs de transcription de l'EMT : *SNAI1* et *TWIST1*. Ces études avaient pour objectif de déterminer si *SNAI1* et *TWIST1* pourraient être des marqueurs immunohistologiques, utilisables en routine pour la détection des tumeurs à fort potentiel métastatique.

L'ensemble des résultats obtenus dans ces deux études, avec des échantillons de tumeurs malignes, est récapitulé dans la Table 16.

	Hayry et al.	Waldmann et al.
Détails de la cohorte		
- B / M / Méta	32 / 18 / 0	35 / 12 / 5
- Statut génétique (M seuls)	ND	
Sporadiques		n = 4 (dont 1 Méta)
<i>RET</i>		n = 5 (dont 2 Méta)
<i>SDHB</i>		n = 3 (dont 2 Méta)
<i>SDHB</i> (NCPM)		n = 2
<i>SDHD</i>		n = 1
Étude de <i>SNAI1</i> (M seuls)		
- Immunohistochimie positive	18/18	
Sporadiques		1/4
<i>RET</i>		4/5
<i>SDHB</i>		4/5
<i>SDHB</i> (NCPM)		2/2
<i>SDHD</i>		1/1
- Spécificité	56%	83%
- Sensibilité	100%	58%
Étude de <i>TWIST1</i> (M seuls)	ND	
- Immunohistochimie positive		
Sporadiques		4/4
<i>RET</i>		4/5
<i>SDHB</i>		5/5
<i>SDHB</i> (NCPM)		2/2
<i>SDHD</i>		1/1
- Spécificité		92%
- Sensibilité		43%
Références	[69]	[70]

Table 16 : Récapitulatif des données d'expression de *SNAI1* et *TWIST1* par immunohistochimie dans les PCC/PGL malins
B : bénin, M : malin, Méta : métastase, ND : Non disponible, NCPM : polymorphisme non-codant

SNAI1 et *TWIST1* sont des marqueurs de malignité importants, car ils sont associés à l'induction de l'EMT, qui dans un contexte tumoral est signe de progression et de récurrence. Les études de Hayry et al. ainsi que de Waldmann et al. aboutissent à la même conclusion : il existe une corrélation entre l'expression de *SNAI1* (et *TWIST1*) et les formes malignes de la maladie. En revanche, et comme c'est le cas avec de nombreux marqueurs utilisés pour le diagnostic de malignité des PCC/PGL, la sensibilité et la spécificité de ces marquages ne sont pas optimales.

SNAI1 et TWIST1 sont des facteurs de transcription et il est donc important de prêter attention à la localisation de l'expression de ces protéines ce qui n'est pas précisé dans l'étude de Waldmann et al. et peut donc induire un biais dans l'interprétation des résultats.

Par ailleurs, ces études ont été réalisées sur des petites cohortes de respectivement 50 et 49 échantillons, dont les annotations génétiques n'étaient malheureusement pas toujours disponibles. Ces informations sont pourtant majeures, car le contexte génétique a un rôle crucial dans la compréhension des mécanismes de tumorigenèse des PCC/PGL, dont on sait qu'ils sont très différents pour les tumeurs porteuses de mutations sur les gènes *SDHx/VHL/FH* (cluster 1) ou sur les gènes *RET/NF1/MAX/TMEM127* (cluster 2). Connaître le statut génétique des patients lorsque l'on étudie un marqueur de malignité dans les PCC/PGL permet ainsi de mettre en évidence si les tumeurs malignes se comportent toutes de la même manière, ou si, comme pour la tumorigenèse, chaque génotype présente une spécificité moléculaire. Le fort potentiel métastatique associé aux tumeurs porteuses de mutations sur le gène *SDHB* suggère l'existence de voies moléculaires propres à ce génotype et impliquées dans le processus de rechute et de dissémination métastatique des tumeurs.

2. Article 1 : L'EMT dans les PCC/PGL *SDHB*-malins

Nous avons donc choisi de réaliser une étude plus globale de l'EMT comme voie moléculaire candidate pouvant expliquer la malignité des PCC/PGL dans notre collection, en prenant en considération à la fois le génotype des patients et le statut de malignité associé.

A. L'apport de la cohorte du réseau COMETE

Créé en 1993 par les Prs Pierre-François Plouin et Xavier Bertagna, le Réseau COMETE (COrtico et MEduLlo-surrénale, les Tumeurs Endocrines) est un réseau national de référence dont l'objectif principal était de promouvoir la recherche fondamentale et clinique sur les tumeurs de la surrénale [367]. Il a donné naissance en 2009 au Centre de référence des Cancers de la surrénale COMETE-Cancer dédié à l'amélioration de la prise en charge des patients atteints de cancers de la surrénale. (<http://www.surrenales.com/reseaux-specialises/inca-comete>)

Les fondateurs de COMETE ont œuvré pour créer une collection d'échantillons (sang, échantillons tumoraux fixés et congelés) et de données biocliniques associées (phénotype clinique et hormonal, statut génétique, données longitudinales de suivi, etc...) de qualité exceptionnelle, qui est, à ce jour, la plus grande collection internationale de ce type. A partir de cette collection, des projets de recherche dont les résultats pourraient avoir un impact sur la prise en charge, le suivi, le traitement ou encore la survie des patients, notamment atteints d'une forme maligne de la maladie, sont menés. Ainsi mon équipe a bénéficié de la collection PCC/PGL du réseau COMETE pour mener des études de génomiques dans le cadre du programme « Carte d'Identité des Tumeurs » (Appels d'Offre CIT-2 & CIT-3) de la Ligue contre le Cancer (<http://cit.ligue-cancer.net/>). Les données de transcriptome de 188 échantillons de PCC/PGL de la collection COMETE étaient déjà disponibles lors de mon arrivée au laboratoire et avaient fait l'objet d'une première étude globale non-supervisée [101] ainsi que d'études plus focalisées sur l'effet Warburg dans les PCC/PGL [368] et sur les conséquences fonctionnelles de la première mutation du gène *SDHA* [158]. Aucune de ces études

n'avaient révélé de particularités associées, ni aux tumeurs malignes qui se répartissent dans l'ensemble des clusters en fonction de leur génotype, ni aux tumeurs *SDHB*, qui se classaient parmi les autres tumeurs *SDHx*.

B. Résumé

Nous avons réalisé l'analyse des données transcriptomiques d'une liste de 94 gènes associés à l'EMT, que nous avons générée à partir des données de la littérature. Cette analyse a révélé deux clusters majeurs d'expression (cluster A et B), le second étant lui-même séparé en 2 sous-groupes (cluster B.1 et B.2, Figure 41). Le cluster B.2 comportait 13 échantillons et des variations d'expression qui représentaient une activation de la voie de l'EMT. De manière particulièrement intéressante, 12 des 13 échantillons étaient porteurs d'une mutation sur le gène *SDHB*. De plus, parmi ces 12 tumeurs, 8 étaient des tumeurs métastatiques (sur les 11 contenues dans notre collection). Cette méthode de classification non supervisée est basée uniquement sur le niveau d'expression des gènes. Elle a permis, pour la première fois, l'isolation des tumeurs *SDHB*-malignes des autres tumeurs, démontrant que l'activation de la voie de l'EMT est une caractéristique propre aux tumeurs *SDHB*-malignes.

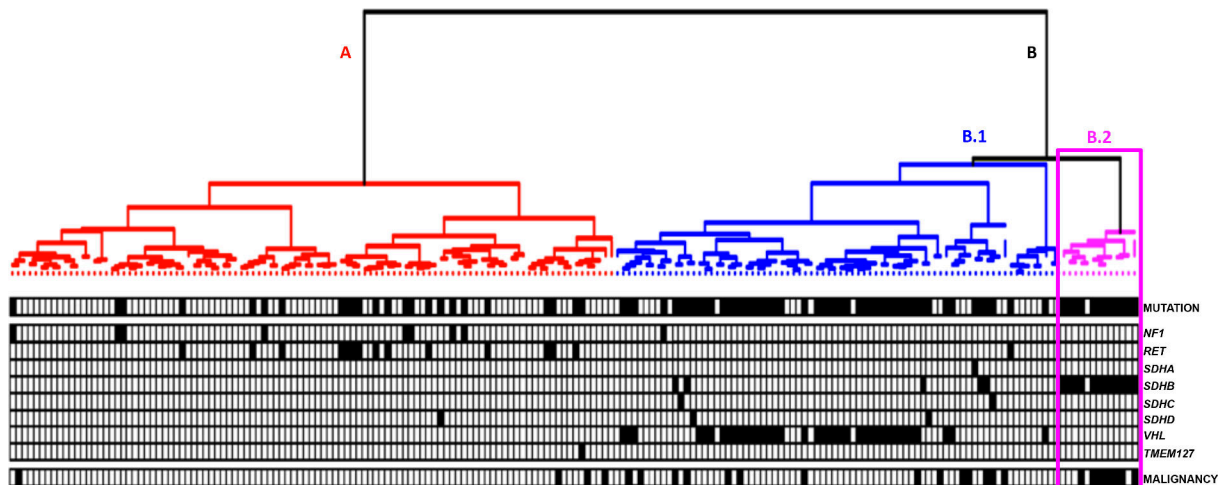


Figure 41 : Classification non-supervisée des 188 PCC/PGL basée sur l'expression des 94 gènes de l'EMT.

Parmi les 94 gènes étudiés, nous avons par exemple pu mettre en évidence une induction de *LOXL2*, *TWIST1* ou encore *TCF3* : trois inducteurs précoces de l'EMT. Nous avons pu décrire une surexpression des métalloprotéases *MMP1* et *MMP2* : des protéases impliquées dans la digestion de la matrice extracellulaire, au rôle majeur dans le processus métastatique. Par ailleurs, nous avons observé une sous expression de la N-cadhérine et de la kératine 19, deux protéines impliquées dans la formation des jonctions cellules/cellules et cellules/MEC, dont la diminution (ou la perte) implique des conséquences importantes sur le maintien de la cohésion des cellules tumorale, avec un impact possible sur leur mobilité.

Par la suite, et afin d'expliquer l'induction transcriptionnelle de l'EMT, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique de *SNAIL*, n'ayant pas pu mettre en évidence de différence d'expression du messenger dans nos échantillons tumoraux. Par immunohistochimie, nous avons pu montrer, sur des coupes d'échantillons tumoraux de PCC/PGL, que tous les échantillons porteurs de mutations du gène *SDHB* dans le cadre d'une maladie métastatique présentaient une expression nucléaire de

SNAIL. Cette localisation reflète dans ces échantillons l'induction de l'EMT observée au niveau transcriptionnel.

C. Article 1

Loriot C. et al.,

“ Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations.”

J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(6): p. E954-62

Epithelial to Mesenchymal Transition Is Activated in Metastatic Pheochromocytomas and Paragangliomas Caused by *SDHB* Gene Mutations

Céline Lorient, Nelly Burnichon, Noémie Gadessaud, Laure Vescovo, Laurence Amar, Rossella Libé, Jérôme Bertherat, Pierre-François Plouin, Xavier Jeunemaitre, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo,* and Judith Favier*

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) 970 (C.L., N.B., N.G., L.A., P.-F.P., X.J., A.-P.G.-R., J.F.), Paris Cardiovascular Research Center, and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique (N.B., X.J., A.-P.G.-R.) and Service d'Hypertension Artérielle (L.A., P.-F.P.), F-75015 Paris, France; Université Paris Descartes (C.L., N.B., L.A., R.L., J.B., P.-F.P., X.J., A.-P.G.-R., J.F.), Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France; Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (L.V.), Ligue Nationale Contre Le Cancer, F-75013 Paris, France; INSERM Unité 1016 (R.L., J.B.), Centre National de la Recherche Scientifique UMR8104, Département d'Endocrinologie, Métabolisme and Cancer, Institut Cochin; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (R.L., J.B.), Hôpital Cochin, Centre de Référence Maladies Rares de la Surrénale, Service des Maladies Endocriniennes et Métaboliques; Rare Adrenal Cancer Network-Cortico Médullosurrénale Tumeur Endocrine (R.L., J.B., P.-F.P., A.-P.G.-R.), Institut National du Cancer, F-75014 Paris, France; and Université Paris Diderot (C.L.), Sorbonne Paris Cité, F-75205, Paris France

Context: Pheochromocytoma and paraganglioma are rare neural-crest-derived tumors. They are metastatic in 15% of cases, and the identification of a germline mutation in the *SDHB* gene is a predictive risk factor for malignancy and poor prognosis. To date, the link between *SDHB* mutations and malignancy is still missing.

Objective: Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a developmental event, reactivated in cancer cells to promote cell mobility and invasiveness. The aim of this study was to address the participation of EMT in the metastatic evolution of pheochromocytoma/paraganglioma.

Design and Patients: Transcriptomic profiling of EMT was performed on 188 tumor samples, using a set of 94 genes implicated in this pathway. Activation of EMT was further confirmed at protein level by immunohistochemistry in a second set of 93 tumors.

Results: Hierarchical unsupervised classification showed that most *SDHB*-metastatic samples clustered together, indicating that EMT is differently regulated in these tumors. Major actors of EMT, metalloproteases and components of cellular junctions, were either up-regulated (*LOXL2*, *TWIST*, *TCF3*, *MMP2*, and *MMP1*) or down-regulated (*KRT19* and *CDH2*) in *SDHB*-metastatic tumors compared with nonmetastatic ones. Interestingly, within metastatic tumors, most of these genes (*LOXL2*, *TWIST*, *TCF3*, *MMP2*, and *KRT19*) also allowed us to discriminate *SDHB*-mutated from non-*SDHB*-related tumors. In the second set of tumors, we studied Snail1/2 expression by immunohistochemistry and observed its specific nuclear translocation in all *SDHB*-metastatic tumors.

Conclusion: We have identified the first pathway that distinguishes *SDHB*-metastatic from all other types of pheochromocytomas/paragangliomas and suggest that activation of the EMT process might play a critical role in the particularly invasive phenotype of this group of tumors. (*J Clin Endocrinol Metab* 97: E954–E962, 2012)

Pheochromocytomas and paragangliomas are rare neuroendocrine tumors that arise from neural-crest-derived cells of the sympathetic and parasympathetic nervous systems. Around 30–40% of these tumors are genetically determined (1), and up to 10 susceptibility genes have now been described: the *RET* protooncogene (2) and the *NF1* (3), *VHL* (4), *SDHA* (5), *SDHB* (6), *SDHC* (7), *SDHD* (8), *SDHAF2* (9), *TMEM127* (10), and *MAX* (11) tumor suppressor genes.

Pheochromocytomas/paragangliomas are malignant in 15% of cases, but to date, there is no validated histological criterion that allows predicting malignancy on the analysis of the primary tumor (12). World Health Organization recommendations of 2004 defined pheochromocytomas and paragangliomas as malignant tumors by the presence of metastasis in a nonchromaffin organ (13). Nevertheless, it was proved that the identification of a germline mutation in the *SDHB* gene is a risk factor for malignancy (14) and poor prognosis (15). The reasons for such a specific association between *SDHB* gene mutations and invasiveness remain unexplained.

Cancer mortality is highly correlated with metastatic dissemination (16). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon that normally occurs during embryonic development but that is reactivated in cancer cells that thereby acquire migratory and invasive properties (17). During EMT, different expression (or activation) of specific transcription factors leads to the loss of epithelial markers and to the acquisition of hallmarks of mesenchymal phenotype (18–20). Cell-cell and cell-matrix junctions are lost, and extracellular matrix is digested by metalloproteases, leading to important consequences for cell mobility and motility (21). Numerous genes and signaling pathways involved in the different steps of EMT induction have been identified. Transcription factors associated with EMT comprise transcription factor (TCF)3, TCF4, and TCF12 as well as Twist-related protein (TWIST)1, TWIST2, and SNAIL family [snail homolog (SNAI)1 and SNAI2] (22). Signaling pathways that trigger EMT include β -catenin, integrins, and growth factors pathways (epidermal, fibroblast, insulin-like, and vascular endothelial growth factors, TGF- β , bone morphogenetic proteins, and IL) (23, 24). Cell-cell junctions are tight, adherens, gap junctions, or desmosomes, but only adherens junctions and desmosomes have been described to be deregulated in cancer cells. The most important components of these cell-cell and cell-matrix junctions are cadherins, armadillo proteins, and cytoskeleton elements (actin microfilaments or cytokeratin intermediate filament) (25).

Several arguments are in favor of an implication of EMT in pheochromocytoma and paraganglioma malignancy. In two studies that respectively analyzed 49 (in-

cluding five metastatic *SDHB* samples) (26) and 50 tumor samples (from 42 patients comprising 10 with a metastatic disease, but without genetic characterization) (27), the overexpression of TWIST1 and SNAI1 was correlated with malignancy of pheochromocytoma and paraganglioma. Besides, TWIST1 and SNAI1 are induced by hypoxia (28, 29), a pathway that is known to be activated in *SDHx*- and *VHL*-related tumors (for review, see Ref. 30) and could therefore participate in *SDHB*-mediated invasiveness. SNAI1 is also activated indirectly by hypoxia, thanks to lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a hypoxia-induced protein widely described as implicated in EMT (18).

In this context, and to progress in the understanding of the metastatic abilities of pheochromocytoma/paraganglioma and in particular of *SDHB*-related tumors, we explored global EMT in these tumors by taking into account both patient genotyping and tumor malignancy.

Patients and Methods

Patients and tumor samples

Gene expression data were obtained from a series of 188 tumor samples (Table 1) (31). It comprised 151 adrenal pheochromocytomas, 27 paragangliomas, and six metastases.

Malignancy was defined by the presence of metastases either at presentation or during a recurrence. Distant metastases were confirmed by histology or as lesions detected by computed tomography or magnetic resonance scans and exhibiting [123 I]meta-iodobenzylguanidine or [111 In]octreotide uptake. The diagnosis of lymph node metastasis was considered only if validated by pathological analysis or in patients with associated extra-paraganglionic metastases. Follow-up was performed as described (32). Germline sequencing was performed for *RET*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *VHL*, *TMEM127*, and *MAX* for all patients. *SDHA* sequencing was performed for all patients that displayed a 5p15 loss of heterozygosity (5) or an *SDHA*-negative immunostaining (33). *SDHAF2* sequencing was performed only for the patients that displayed an *SDH*-like tran-

TABLE 1. Genetic characteristics of the tumor samples included in the microarray study

	Total	Nonmetastatic	Metastatic
Sporadic	119	108	11
<i>RET</i> s	6	6	0
<i>VHL</i> s	11	9	2
Inherited	69	54	15
<i>RET</i>	9	9	0
<i>NF1</i>	9	9	0
<i>VHL</i>	27	24	3
<i>SDHA</i>	1	1	0
<i>SDHB</i>	17	6	11
<i>SDHC</i>	2	1	1
<i>SDHD</i>	3	3	0
<i>TMEM127</i>	1	1	0
Total	188	162	26

s, Somatic mutation.

scriptome signature (31). Finally, *NF1* sequencing was not performed, the diagnosis being exclusively based on clinical parameters. Tumor samples lacking germline mutation in the main susceptibility genes are referred to as sporadic tumors.

This collection displays a distribution of benign, referred to as nonmetastatic (86%), and malignant, referred to as metastatic (14%), tumors, and inherited (37%) and sporadic (63%) cases, which is representative of the proportions previously reported in large cohorts of patients. Tumor samples were collected by the COMETE network from 177 patients operated on between 1993 and 2008 in two referral centers in Paris (Georges Pompidou European Hospital and Cochin Hospital). The procedures used for pheochromocytoma/paraganglioma diagnosis and genetic testing were in accordance with institutional guidelines (32).

For immunohistochemistry analyses, we studied 93 paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded tumors collected from 81 patients (Supplemental Table 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). Fifty-nine of these samples were also included in the microarray study. In this second set of tumors, 24% were metastatic and 54% presented a mutation in one of the susceptibility genes. Three patients were diagnosed for type 1 neurofibromatosis (NF1). The genetic testing identified a *RET* mutation in four patients, an *SDHB* mutation in 11 patients (five metastatic, six nonmetastatic), an *SDHD* mutation in four patients, an *SDHC* mutation in two patients, a *VHL* mutation in seven patients, and an *SDHA* and a *TMEM127* mutation in one patient, respectively. This collection also contained seven tumors harboring a somatic *VHL* mutation and one with a somatic *RET* mutation (31).

Ethics statement

Informed signed consent for germline and somatic DNA analysis was obtained from each patient recruited by the COMETE network, and the study was formally approved by an institutional review board [Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France III, January, 2007].

Microarray analysis of gene expression

Tumor samples (20–30 mg) were powdered under liquid nitrogen. RNA were extracted using RNeasy mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). RNA quality was assessed by electrophoresis on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Massy, France), and quantity was evaluated using a Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France). Stringent criteria for RNA quality were applied to rule out degradation, especially a 28S:18S rRNA ratio above 1.5. Microarray analyses were performed using 3 μ g total RNA of each sample as starting material and 10 μ g cRNA per hybridization (GeneChip Fluidics Station 400; Affymetrix, High Wycombe, UK). The total RNA was amplified and labeled following the manufacturer's one-cycle target labeling protocol (<http://www.affymetrix.com>). The labeled cDNA were then hybridized to HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix GeneChip arrays (Affymetrix), and chips were scanned with a GCOS version 1.4. Those microarrays were described as being highly reproducible and as displaying a higher level of concordance with quantitative RT-PCR data than others (34).

Statistical analysis

Except when indicated, all transcriptome analysis was carried out using either an assortment of R system software (<http://www.R-project.org>, version 2.9.1) packages including those of

Bioconductor (35) (version 1.8) or original R code. R packages and versions are indicated when appropriate. Unsupervised classification was performed using a list of 94 genes implicated in EMT (Supplemental Table 2). Such a list was established based on The Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) RT² Profiler PCR Array (SABiosciences, Courtaboeuf, France), and on the literature data.

Supervised analyses of 1) nonmetastatic *vs.* non-*SDHB*-metastatic tumors, 2) *SDHB*-metastatic *vs.* non-*SDHB*-metastatic, and 3) nonmetastatic *vs.* *SDHB*-metastatic tumors were performed using the StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC). Differences were evaluated by ANOVA Bonferroni test. A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

We used the R package affyQCReport to generate a quality control report for all chips (CEL files) from the Carte d'Identité des Tumeurs (CIT) discovery series. Raw feature data from Affymetrix HG-U133A Plus 2.0 GeneChip microarrays are normalized using robust multiarray average method (R Package affy) (36).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissues were used to prepare 6- μ m sections, which were mounted on Superfrost plus glass slides.

We used a SNAI1/2 antibody (Abcam, Cambridge, MA; ab85936, 1/100), and heat-mediated antigen retrieval was performed using 10 mM citrate buffer (pH 6) for 15 min. Biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories, EURO BIO/ABCYS, Les Ulis, France) was used, because it reacts with avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC Elite; Vector Laboratories). For peroxidase activity detection, we used Histogreen (EURO BIO/ABCYS). Negative control was performed by omitting the primary antibody.

Acquisitions were performed using Leica DM400B microscope, with $\times 40$ objective, thanks to Leica Application Suite software version 2.8.1 and a Leica DFC420C camera.

All slides were coded and evaluated blindly by two independent observers. Slides were either negative or classified according to the localization of immunolabeling: 1) cytoplasmic, when cells presented only a cytoplasmic immunolabeling and never a nuclear staining; 2) cytoplasmic and nuclear, when the section displayed either cytoplasm-restricted or immunostaining in both cell compartments; and 3) nuclear, when the section displayed zones of cells with a positive immunostaining in the nucleus and an absent or very weak signal in the cytoplasm.

Results

EMT is specifically regulated in *SDHB*-metastatic pheochromocytomas/paragangliomas

Unsupervised classification of our cohort of 188 pheochromocytomas and paragangliomas was performed using a list of 280 probe sets corresponding to 94 actors of the EMT process (Supplemental Table 2), comprising early EMT inducers (transcription factors), members of signaling pathways that trigger EMT (hypoxia, TGF β /bone morphogenetic proteins, growth factors, and β -catenin pathways), and components of cell-cell and cell-matrix junctions. Such analysis identified two main clusters in the higher partition (Fig. 1). The

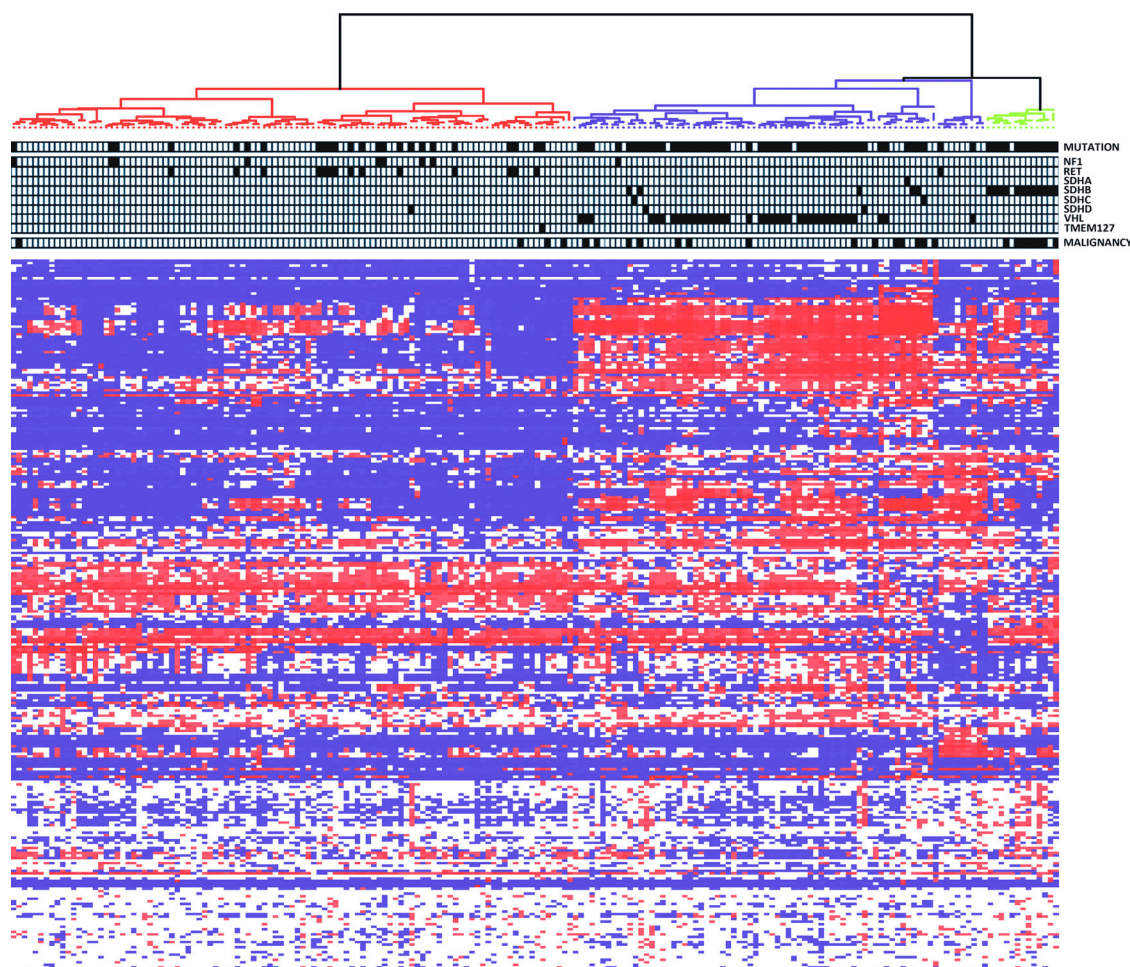


FIG. 1. Microarray analysis of EMT in pheochromocytoma/paraganglioma. Unsupervised hierarchical clustering analysis of 188 samples according to the expression of 94 genes implicated in the EMT pathway. Expression profiles are shown as a heatmap indicating high (red) and low (blue) expression according to a log2-transformed scale. The higher partition allows distinguishing all *SDHB*-metastatic pheochromocytoma/paraganglioma from all others patients. Black squares indicate the presence of an event or of a mutation in the corresponding tumor samples.

first one comprised 103 samples including 79 sporadic samples, eight of nine *NF1* tumors, eight of nine *RET* samples, all (six of six) samples with a somatic *RET* mutation, the *TMEM127*-related tumor, and one of the three *SDHD*-mutated tumors. It contained only four metastatic samples, all sporadic. The second one, which contained 22 of 26 metastatic samples, was divided into two subclusters. One was composed of 72 samples, including 39 inherited tumors (all *VHL*, *SDHA*, and *SDHC* samples, five of 17 *SDHB*, two of three *SDHD*, one of nine *RET*, and one of nine *NF1* tumors) and 33 sporadic ones. It included 58 nonmetastatic and 14 metastatic tumors (three of 11 *SDHB*, one of one *SDHC*, three of three *VHL*, two of two *VHL*s, and five of nine sporadic). The second subcluster contained 13 samples including eight *SDHB*-metastatic, four *SDHB*-nonmetastatic, and one sporadic nonmetastatic tumor. Hence, all but three *SDHB*-metastatic tumors of the series (eight of 11, 73%) were isolated in this last cluster (Fig. 1).

***LOXL2*, *TWIST1*, and *TCF3* are overexpressed in *SDHB*-metastatic pheochromocytoma**

We precisely assessed the microarray RNA expression profile of some important actors of the EMT pathway, such as *LOXL2*, and the basic helix-loop-helix proteins *TWIST1* and *TCF3*. We compared the gene expression data of each one in nonmetastatic ($n = 162$), non-*SDHB*-metastatic ($n = 13$), and *SDHB*-metastatic ($n = 11$) tumors (Fig. 2A). *LOXL2* and *TWIST1* RNA levels of expression were markedly increased in *SDHB*-related metastatic tumors compared both with nonmetastatic [fold change (Fc) = 5.02, $P < 0.0001$; Fc = 14.74, $P < 0.0001$] and also with non-*SDHB*-metastatic ones (Fc = 2.9, $P < 0.0001$ and Fc = 6.1, $P < 0.0001$, respectively). Although to a lesser extent, *TCF3* was also significantly up-regulated in *SDHB*-metastatic samples compared with nonmetastatic (Fc = 1.57, $P < 0.0001$) and with non-*SDHB*-metastatic tumors (Fc = 1.2, $P < 0.05$). A slight up-regulation of *TCF3* was also observed in non-*SDHB*-

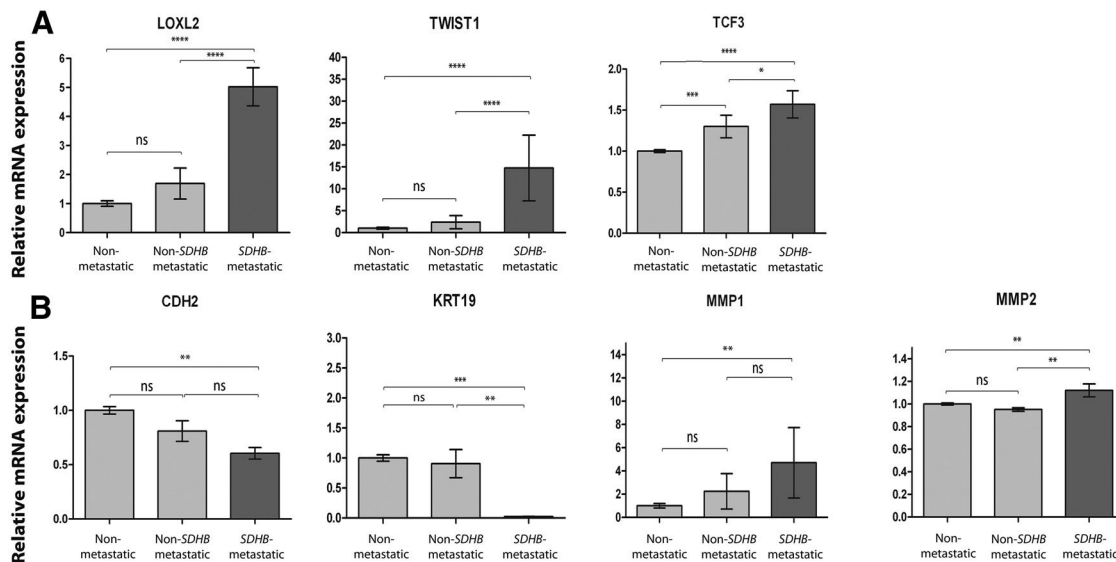


FIG. 2. Early markers of EMT and effects on cell-cell and cell-matrix junction components in pheochromocytoma/paraganglioma. Microarray evaluation of *LOXL2*, *TWIST1*, and *TCF3* (A) and of *CDH2*, *KRT19*, *MMP1*, and *MMP2* (B) expression. Comparisons were between nonmetastatic ($n = 162$) and non-SDHB-metastatic ($n = 13$), nonmetastatic and SDHB-metastatic ($n = 11$), and non-SDHB-metastatic and SDHB-metastatic tumors. Expression levels are presented relative to the nonmetastatic group; data are mean \pm SEM. ****, $P < 0.0001$; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant.

metastatic tumors compared with nonmetastatic ones ($F_c = 1.3$, $P < 0.001$).

SDHB-metastatic tumors lose cell-cell and cell-matrix junction markers

We further studied the expression of cell-cell and cell-matrix junction components. In adrenal medulla, which derives from neural crest cells, the only expressed cadherin is neural cadherin (N-cadherin) (37).

We found a major down-regulation of *KRT19* that encodes an intermediate filament required for desmosomes and hemi-desmosomes formation, in SDHB-metastatic *vs.* non-metastatic and non-SDHB-metastatic samples ($F_c = -42.4$, $P < 0.001$; and $F_c = -38.4$, $P < 0.01$, respectively). *CDH2*, which encodes N-cadherin, was moderately but significantly down-regulated in SDHB-metastatic *vs.* nonmetastatic samples ($F_c = -1.65$, $P < 0.05$) (Fig. 2B).

We also observed differences in the expression of *MMP1* and *MMP2*, two metalloproteases implicated in cell-matrix adhesion. In SDHB-metastatic tumors *vs.* non-metastatic tumors, *MMP1* was clearly up-regulated ($F_c = 4.7$, $P < 0.01$), whereas *MMP2* presented a minor up-regulation ($F_c = 1.12$, $P < 0.01$). *MMP2* was also slightly increased in SDHB-metastatic tumors *vs.* non-SDHB-metastatic samples ($F_c = 1.18$, $P < 0.01$).

Pseudohypoxia partially participates in the regulation of EMT in pheochromocytomas and paragangliomas

LOXL2, *TWIST1*, and *TCF3* are transcriptionally induced by hypoxia. We thus postulated that their overex-

pression in SDHB-metastatic tumors may reflect the pseudohypoxic drive known to be associated with succinate dehydrogenase (SDH) inactivation (38). We thus evaluated the levels of expression of the previously analyzed EMT-associated genes in several subgroups of inherited tumors and compared them with those observed in the group of nonmetastatic sporadic tumors, used as a control (Supplemental Fig. 1).

Although to a lesser extent than that observed in SDHB-metastatic samples, we did observe a significant overexpression of *LOXL2* and partly of *TCF3* in pseudo hypoxic tumors harboring *VHL* and/or *SDHD* genes mutations. Accordingly, *CDH2* tended to be down regulated in *SDHD* and *VHL* samples compared with nonmetastatic sporadic. In contrast, *TWIST1*, *KRT19* and *MMP1* seemed to be specifically regulated in SDHB-mutated metastatic tumors.

SDHB-related tumors display SNAI1/2 nuclear translocation

SNAI1/2 is a transcription factor that represses the expression of ectodermal genes within the mesoderm and plays a critical role during mesoderm formation in the embryo. It is implicated in metastasis and is sufficient to induce EMT (18, 22, 39).

We analyzed its mRNA expression in our large cohort of 188 samples but found no major difference in its expression in any of the groups studied by microarray (Supplemental Fig. 1). We then studied SNAI1/2 protein expression by immunohistochemistry on 93 paraffin-embedded tumor samples (Supplemental Table 1). We

TABLE 2. SNAI1/2 localization according to tumor type

Tumor type	No expression	Cytoplasmic expression	Nuclear and cytoplasmic expression	Nuclear translocation
<i>NF1</i> nonmetastatic (n = 3)		2	1	
<i>RET</i> nonmetastatic (n = 5)		5		
<i>SDHA</i> nonmetastatic (n = 2)		2		
<i>SDHB</i> metastatic (n = 9)				9
<i>SDHB</i> nonmetastatic (n = 6)	1	3	2	
<i>SDHC</i> nonmetastatic (n = 2)			2	
<i>SDHD</i> nonmetastatic (n = 5)	1	2	2	
<i>TMEM127</i> nonmetastatic (n = 2)		2		
<i>VHL</i> metastatic (n = 2)		2		
<i>VHL</i> nonmetastatic (n = 14)	1	9	1	3
Sporadic metastatic (n = 11)		7	2	2
Sporadic nonmetastatic (n = 32)	3	17	9	3

did not find any quantitative difference in the level of protein expression in nonmetastatic *vs.* metastatic tumors, but interestingly, we observed modifications in its cellular sublocalization between tumor types. Tumors were thus classified in four different subgroups according to SNAI1/2 localization (Table 2). There was no expression of the protein in six nonmetastatic tumors (Fig. 3A). Fifty-one tumor samples displayed a cytoplasmic expression of SNAI1/2 (Fig. 3B), and 19 samples showed both cytoplasmic and nuclear expression (Fig. 3C). The latter groups contained various types of tumors (indifferently nonmetastatic, metastatic, genetically determined, and sporadic). Finally, SNAI1/2 was restricted to the nucleus in 17 samples (Fig. 3D). This group included all *SDHB*-related metastatic tumors.

Discussion

In this study, we evaluated the expression of early markers of epithelial to mesenchymal transition such as LOXL2, TWIST1, TCF3, or SNAI1/2, as well as cell-cell and cell-matrix junction components, in a large cohort of pheochromocytomas and paragangliomas. Our results reveal that EMT is specifically induced in *SDHB*-related metastatic tumors and suggest that this process may be responsible, or at least involved, in the acquisition of the particular metastatic properties of this subset of tumors. These data provide the first relevant clue to elucidate the link between *SDHB*-related pheochromocytoma/paraganglioma and metastatic diffusion.

To evaluate the hypothesis of a role of EMT in metastatic pheochromocytoma and paraganglioma, we used the microarray expression profile of 94 EMT-associated genes to perform an unsupervised classification of 188 pheochromocytomas and paragangliomas that comprised 26 metastatic samples. This study led to a partition in two clusters. Interestingly, all but four metastatic samples were classified in the second cluster. These four samples all corresponded to patients affected by sporadic, slowly evolving adrenal pheochromocytomas (three are still alive 22, 23, and 25 yr after the first surgery, respectively, and one died 36 yr after the first surgery). In the second cluster, a subgroup of 13 tumors was isolated; it comprised all *SDHB*-mutated metastatic tumors, except three samples. To our knowledge, this is the first transcriptome-based classification

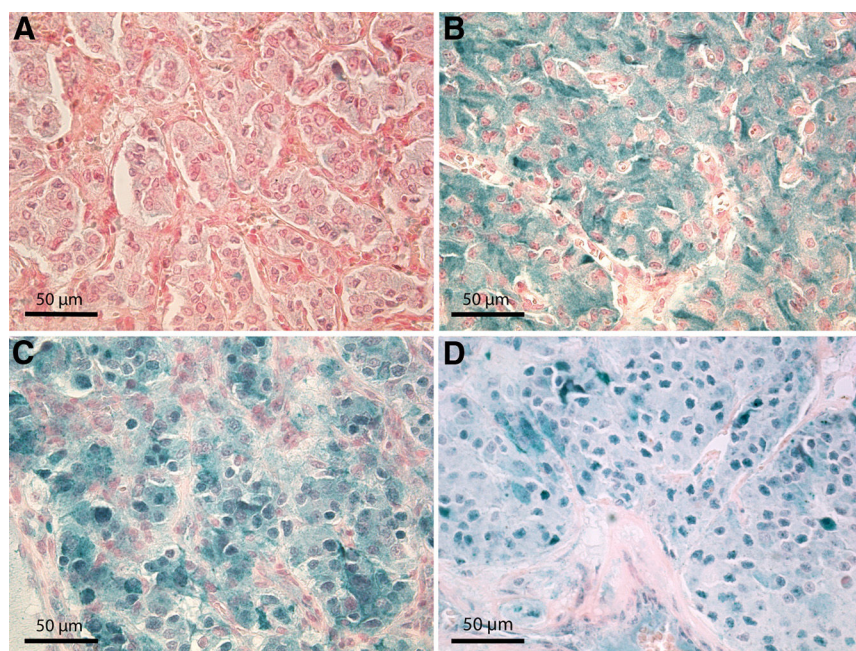


FIG. 3. Differential localization of SNAI1/2 in pheochromocytoma/paraganglioma. SNAI1/2 immunohistochemistry was performed on 93 samples. Tumors were classified regarding SNAI1/2 protein localization, which was either absent (A), restricted to the cytoplasm (B), cytoplasmic and nuclear (C), or strictly nuclear (D). Calibration bar, 50 μ m.

that leads to the isolation of such a subgroup of *SDHB*-metastatic tumors. This cluster also contained four *SDHB* nonmetastatic tumors (Supplemental Table 3, patients 1, 4, 5, and 6). The question of the true benignity of a tumor is always difficult in pheochromocytomas and paragangliomas, particularly in an *SDHB*-mutated context. These tumors corresponded to four young patients at diagnosis (10–33 yr old). One of them presents a lung nodule, which is putatively a metastasis of his pheochromocytoma. However, in the absence of histological confirmation or [123 I]meta-iodobenzylguanidine or [111 In]octreotide uptake, we cannot classify him in the metastatic group, according to our diagnostic criteria. One has a very long disease-free survival without recurrence (30 yr) compared with the two others (respectively, 0 and 11 yr after diagnosis) (Supplemental Table 3). Hence, we cannot exclude that three of these four patients are actually affected by a malignant, not yet metastatic form of their disease. They should now benefit from specific attention in follow-up. The last tumor was a sporadic nonmetastatic paraganglioma, which systematically clustered with *SDHx*-related tumors in global unsupervised classification and which we recently defined as a pseudo-*SDHx* tumor (31). Here, we confirm this observation and suggest that this tumor is actually similar to *SDHB*-metastatic ones.

TWIST1, *LOXL2*, *TCF3*, and *SNAI1/2* have been described to be implicated in the metastatic process of numerous malignant diseases such as breast (20, 39), pancreatic, adrenal (26, 40), or renal (19) cancer. Here, we show that not only *LOXL2* and *TWIST1* but also *TCF3* are significantly up-regulated in *SDHB*-metastatic samples, which suggests that they may also be key partners of *SDHB*-dependant pheochromocytoma/paraganglioma malignancy. These genes are known to be overexpressed in hypoxic conditions (19, 28, 29). Although pseudohypoxia does appear to participate in the induction of *LOXL2* or *TCF3* in *SDHB*-related tumors, this process does not explain the global activation of EMT observed in this subset of tumors. Indeed, the global activation of this pathway (up-regulation of *LOXL2*, *TWIST1*, *TCF3*, *MMP1*, and *MMP2*, combined with the down-regulation of *CDH2* and *KRT19*) seemed to be restricted to the association of an *SDHB* mutation with a metastatic phenotype. For example, *TWIST* overexpression and *SNAI1* nuclear translocation seem to be very specific of *SDHB*-metastatic samples. Hence, we speculate that *SDHB* may modulate EMT-associated genes in a distinctive way, not found in other *SDHx*- or *VHL*-related tumors.

SNAI1 is sufficient to induce EMT in cancer cells (18, 39), and two studies recently described a correlation between its overexpression and malignancy in pheochromocytoma and paraganglioma (26, 27). In this study, we did

not observe a significant increase in *SNAI1/2* expression in the group of metastatic tumors, neither by microarray nor by immunohistochemistry. In contrast, we observed a dramatic change in *SNAI1/2* localization, which was specifically translocated to the nucleus in all *SDHB*-metastatic tumors. The reason for such a discrepancy with the previously reported studies may be due to differences in antibodies or immunohistochemistry techniques but is difficult to address because one did not report the genotype of the patients and the other contained only three *SDHB* metastatic patients. Such nuclear translocation, which reflects the activation of *SNAI1/2* as a transcription factor, may be the initial step in the activation of EMT, leading to metastasis in *SDHB*-mutated cells. The mechanism involved in this process remains unknown but also appears to be independent of the pseudohypoxic status. It suggests an unexpected and new function of *SDHB* that will have to be further addressed. Anyhow, *SNAI1/2* nuclear translocation could be a criterion allowing gathering of all *SDHB*-metastatic tumor and should be further studied as an innovative prognostic or therapeutic target for patients affected by *SDHB*-related metastatic pheochromocytoma or paraganglioma.

In conclusion, this study identifies EMT as the first pathway that may be responsible for the specific metastatic properties of *SDHB*-related pheochromocytoma or paraganglioma and suggests that *SNAI1/2* nuclear translocation may be used as a histological marker of malignancy for *SDHB*-related tumors. Although these observations will have to be validated prospectively in other large series of tumors, they may lead to important clinical consequences in the management of patients harboring *SDHB* mutations.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Judith Favier, Centre de recherche cardiovasculaire de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, 56 rue Leblanc 75015 Paris, France. E-mail: judith.favier@inserm.fr.

This work was supported by the Program Hospitalier de Recherche Clinique Grant COMETE 3 (AOM 06 179) and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR 08 GENOPATH 029 MitOxy). This work is part of the national program "Cartes d'Identité des Tumeurs" funded and developed by the "Ligue Nationale contre le Cancer" (<http://cit.ligue-cancer.net>). We thank the GIS-Institut des Maladies Rares for the PGL.NET Network.

Complete data sets are available online as ArrayExpress entry E-MTAB-733 (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>).

Disclosure Summary: The authors have declared that no conflicts of interest exist.

References

- Gimenez-Roqueplo AP, Burnichon N, Amar L, Favier J, Jeunemaitre X, Plouin PF 2008 Recent advances in the genetics of pheochromocytoma and functional paraganglioma. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:376–379
- Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Eldon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, et al 1993 Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363:458–460
- Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, et al 1990 Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249:181–186
- Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, et al 1993 Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260:1317–1320
- Burnichon N, Brière JJ, Libé R, Vescovo L, Rivière J, Tissier F, Jouanno E, Jeunemaitre X, Bénit P, Tzagoloff A, Rustin P, Bertherat J, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP 2010 SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet* 19:3011–3020
- Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, Sköldb-berg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER 2001 Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet* 69:49–54
- Niemann S, Müller U 2000 Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet* 26:268–270
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW 3rd, Corneliisse CJ, Devilee P, Devlin B 2000 Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287:848–851
- Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephoure N, Bayley JP, Kunst H, Devilee P, Cremers CW, Schiffman JD, Bentz BG, Gygi SP, Winge DR, Kremer H, Rutter J 2009 SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science* 325:1139–1142
- Qin Y, Yao L, King EE, Buddavarapu K, Lenci RE, Chocron ES, Lechleiter JD, Sass M, Aronin N, Schiavi F, Boaretto F, Opoche G, Toledo RA, Toledo SP, Stiles C, Aguiar RC, Dahia PL 2010 Germ-line mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet* 42:229–233
- Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R, Honrado E, Ramos-Medina R, Caronia D, Pita G, Gómez-Graña A, de Cubas AA, Inglada-Pérez L, Maliszewska A, Taschin E, Bobisse S, Pica G, Loli P, Hernández-Lavado R, Díaz JA, Gómez-Morales M, González-Neira A, Roncador G, Rodríguez-Antona C, Benítez J, et al. 2011 Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet* 43:663–667
- Chrisoulidou A, Kaltsas G, Ilias I, Grossman AB 2007 The diagnosis and management of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Relat Cancer* 14:569–585
- Lloyd R, Tischler A, Kimura N, McNicol A, Young JW 2004 Adrenal tumours: introduction. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, eds. *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics: tumours of endocrine organs*. Lyon, France: IARC Press
- Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M, Nau V, Khau Van Kien P, Corvol P, Plouin PF, Jeunemaitre X 2003 Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res* 63:5615–5621
- Amar L, Baudin E, Burnichon N, Peyrard S, Silvera S, Bertherat J, Bertagna X, Schlumberger M, Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo AP, Plouin PF 2007 Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3822–3828
- Mehlen P, Puisieux A 2006 Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6:449–458
- Kuriyama S, Mayor R 2008 Molecular analysis of neural crest migration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:1349–1362
- Peinado H, Portillo F, Cano A 2005 Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3 β . *Cell Cycle* 4:1749–1752
- Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, Semenza GL 2006 Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFX1A, and ZFX1B. *Cancer Res* 66:2725–2731
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA 2004 Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927–939
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK 2011 Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 278:16–27
- Peinado H, Olmeda D, Cano A 2007 Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7:415–428
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW 2006 The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172:973–981
- Cavallaro U, Dejana E 2011 Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:189–197
- Dusek RL, Attardi LD 2011 Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 11:317–323
- Waldmann J, Slater EP, Langer P, Buchholz M, Ramaswamy A, Walz MK, Schmid KW, Feldmann G, Bartsch DK, Fendrich V 2009 Expression of the transcription factor snail and its target gene twist are associated with malignancy in pheochromocytomas. *Ann Surg Oncol* 16:1997–2005
- Häyry V, Salmenkivi K, Arola J, Heikkilä P, Haglund C, Sariola H 2009 High frequency of SNAIL-expressing cells confirms and predicts metastatic potential of pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer* 16:1211–1218
- Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ 2008 Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 10:295–305
- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ 2006 Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440:1222–1226
- Favier J, Gimenez-Roqueplo AP 2010 Pheochromocytomas: the (pseudo)-hypoxic hypothesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24:957–968
- Burnichon N, Vescovo L, Amar L, Libé R, de Reynies A, Venisse A, Jouanno E, Laurendeau I, Parfait B, Bertherat J, Plouin PF, Jeunemaitre X, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP 2011 Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Hum Mol Genet* 20:3974–3985
- Plouin PF, Gimenez-Roqueplo AP 2006 Initial work-up and long-term follow-up in patients with pheochromocytomas and paragangliomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:421–434
- Korpershoek E, Favier J, Gaal J, Burnichon N, van Gessel B, Oudijk L, Badoual C, Gadessaud N, Venisse A, Bayley JP, van Dooren MF, de Herder WW, Tissier F, Plouin PF, van Nederveen FH, Dinjens WN, Gimenez-Roqueplo AP, de Krijger RR 2011 SDHA immunohistochemistry detects germline SDHA gene mutations in apparently sporadic paragangliomas and pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E1472–E1476
- de Reynies A, Geromin D, Cayuela JM, Petel F, Dessen P, Sigaux F, Rickman DS 2006 Comparison of the latest commercial short and long oligonucleotide microarray technologies. *BMC Genomics* 7:51
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber

- W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J 2004 Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80
36. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP 2003 Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4:249–264
37. Khorram-Manesh A, Ahlman H, Jansson S, Nilsson O 2002 N-cadherin expression in adrenal tumors: upregulation in malignant pheochromocytoma and downregulation in adrenocortical carcinoma. *Endocr Pathol* 13:99–110
38. Brière JJ, Favier J, Bénit P, El Ghouzzi V, Lorenzato A, Rabier D, Di Renzo MF, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P 2005 Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1alpha nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet* 14:3263–3269
39. Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA 2005 The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 8:197–209
40. Waldmann J, Feldmann G, Slater EP, Langer P, Buchholz M, Ramaswamy A, Saeger W, Rothmund M, Fendrich V 2008 Expression of the zinc-finger transcription factor Snail in adrenocortical carcinoma is associated with decreased survival. *Br J Cancer* 99:1900–1907



Get ready for the 2012 ABIM board exam in endocrinology, diabetes, and metabolism with **Endocrine Board Review, 3rd edition.**

<http://www.endo-society.org/brdrv>

Patient N°		Age	Sex	Mutation	Benin / Malignant	Tumour site	SNAI1/2 localisation
1	*	39	M	-	B	RA	C
2		36	F	-	B	CPG	C + N
3	*	28	M	-	B	RA	C
4		ns	F	-	B	CPG	C + N
5		56	F	-	B	APG	C
6	*	33	M	-	B	RA	Neg
7	*	85	F	-	B	RA	C
8	*	54	F	-	B	RA	C
9		61	F	-	B	RA	C
10		62	M	-	B	RA	C
11		34	M	-	B	ns	C
12	*	28	M	-	B	RA	C
13	*	62	M	-	B	ns	C + N
14	*	36	F	-	B	LA	C
15	*	40	F	-	B	LA	Neg
16		ns	M	-	B	ns	C
17	*	66	F	-	B	RA	C
18	*	50	F	-	B	APG	C
19	*	27	M	-	B	RA	N
20		ns	F	-	B	ns	C + N
21	*	57	F	-	B	LA	N
22		81	F	-	B	RA	C + N
23	*	31	F	-	B	APG	C + N
24	*	56	F	-	B	RA	C
25		63	F	-	B	RA	C
26	*	71	F	-	B	RA	Neg
27		36	M	-	B	RA	C
				-	B	LA	C
28		16	F	-	B	TPG	C + N
29	*	42	F	-	B	LA	N
30	*	63	M	-	B	RA	C + N
31		71	F	-	B	APG	C + N
32		47	M	-	M	APG	C
33		81	M	-	M	RA	C
34		51	M	-	M	APG	C + N
35	*	42	F	-	M	APG	C
	*			-	M	APG	C
36		58	M	-	M	meta	C
37		47	M	-	M	LA	C
38		66	M	-	M	LA	C + N
39	*	48	M	-	M	LA	C
40	*	74	F	-	M	meta	N
41	*	65	F	-	M	meta	N
42	*	41	F	<i>NF1</i>	B	LA	C + N
43	*	47	F	<i>NF1</i>	B	LA	C
44	*	41	F	<i>NF1</i>	B	LA	C
45	*	33	F	<i>RET</i>	B	LA	C
46	*	81	F	<i>RET</i>	B	LA	C
47	*	66	F	<i>RET</i>	B	RA	C
48	*	36	F	<i>RET</i>	B	RA	C
49	*	75	M	<i>RETs</i>	B	LA	C
50		50	M	<i>SDHA</i>	B	APG	C
				<i>SDHA</i>	B	APG	C
51	*	24	F	<i>SDHB</i>	B	LA	C + N
52		20	F	<i>SDHB</i>	B	ns	Neg
53		23	F	<i>SDHB</i>	B	LA	C
54		41	F	<i>SDHB</i>	B	CPG	C + N
55	*	42	F	<i>SDHB</i>	B	LA	C
56		30	M	<i>SDHB</i>	B	APG	C
57	*	48	F	<i>SDHB</i>	M	meta	N
58	*	54	F	<i>SDHB</i>	M	APG	N
59	*	35	M	<i>SDHB</i>	M	RA	N
	*			<i>SDHB</i>	M	meta	N
	*			<i>SDHB</i>	M	meta	N
	*			<i>SDHB</i>	M	meta	N
60		62	M	<i>SDHB</i>	M	APG	N
				<i>SDHB</i>	M	APG	N
61		55	F	<i>SDHB</i>	M	RA	N
62		55	F	<i>SDHC</i>	B	CPG	C + N
63	*	21	F	<i>SDHC</i>	B	TPG	C + N
64	*	69	M	<i>SDHD</i>	B	CPG	C
65		50	M	<i>SDHD</i>	B	ns	C

				<i>SDHD</i>	B	ns	Neg
66		ns	M	<i>SDHD</i>	B	CPG	C + N
67	*	45	M	<i>SDHD</i>	B	CPG	C + N
68	*	59	F	<i>TMEM127</i>	B	APH	C
	*			<i>TMEM127</i>	B	APH	C
69	*	31	M	<i>VHL</i>	B	ns	C
	*			<i>VHL</i>	B	ns	N
70	*	26	M	<i>VHL</i>	B	RA	N
71	*	28	M	<i>VHL</i>	B	APH	C
	*			<i>VHL</i>	B	APH	N
72	*	20	F	<i>VHL</i>	B	RA	C
73	*	38	M	<i>VHL</i>	B	LA	C
74	*	25	F	<i>VHL</i>	B	APG	C
75	*	33	M	<i>VHL</i>	B	RA	C
76	*	57	M	<i>VHL</i>	B	LA	C
77	*	35	F	<i>VHLs</i>	B	LA	C + N
78		27	M	<i>VHLs</i>	B	APG	C
79	*	23	M	<i>VHLs</i>	B	RA	C
80	*	32	F	<i>VHLs</i>	B	RA	Neg
81	*	34	F	<i>VHLs</i>	M	APG	C
	*			<i>VHLs</i>	M	APG	C

SUPPLEMENTAL TABLE 1: Biological and clinical data and results of SNAI1/2 immunohistochemistry

APH: Adrenal pheochromocytoma, LA: Left adrenal, RA: Right adrenal,

APG: Abdominal paraganglioma, TPG: Thoracic paraganglioma,

CPG: Cervical paraganglioma, meta: metastasis,

B: Benign, M: Malignant

* indicates patients also present in the microarray study

s: somatic mutation, ns: not specified

C: cytoplasmic, C+N: cytoplasmic and nuclear, N: nuclear, Neg: absence of expression

Gene Bank	Symbol	Description
NM_024060	AHNAK	AHNAK nucleoprotein
NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
NM_006129	BMP1	Bone morphogenetic protein 1
NM_001719	BMP7	Bone morphogenetic protein 7
NM_004342	CALD1	Caldesmon 1
NM_018584	CAMK2N1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
NM_001233	CAV2	Caveolin 2
NM_004360	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
NM_001792	CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
NM_000089	COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
NM_000090	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1
NM_000393	COL5A2	Collagen, type V, alpha 2
NM_001904	CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1
NM_004949	DSC2	Desmocollin 2
NM_004415	DSP	Desmoplakin
NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
NM_001982	ERBB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
NM_000125	ESR1	Estrogen receptor 1
NM_144503	F11R	F11 receptor
NM_005130	FGFBP1	Fibroblast growth factor binding protein 1
NM_002026	FNI	Fibronectin 1
NM_005251	FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)
NM_003507	FZD7	Frizzled homolog 7 (Drosophila)
NM_004126	GNG11	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11
NM_173849	GSC	Goosecoid homeobox
NM_002093	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
NM_003483	HMG2	High mobility group AT-hook 2
NM_001552	IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4
NM_000577	IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist
NM_004517	ILK	Integrin-linked kinase
NM_002205	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
NM_000214	JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)
NM_000526	KRT14	Keratin 14
NM_002275	KRT15	Keratin 15
NM_000422	KRT17	Keratin 17
NM_000224	KRT18	Keratin 18
NM_002276	KRT19	Keratin 19
NM_005556	KRT7	Keratin 7
NM_002273	KRT8	Keratin 8
NM_001178102	LOX	Lysyl oxidase
NM_002318	LOXL2	Lysyl oxidase-like 2
NM_005909	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
NM_000248	MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
NM_001145938.1	MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, type IV collagenase)
NM_002422	MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, type IV collagenase)
NM_002444	MSN	Moesin
NM_002447	MST1R	Macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)
NM_018055	NODAL	Nodal homolog (mouse)
NM_017617	NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
NM_015901	NUDT13	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 13
NM_002538	OCLN	Occludin
NM_002609	PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
NM_016445	PLEK2	Pleckstrin 2
NM_015704	PPPDE2	PPPDE peptidase domain containing 2
NM_005607	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
NM_003463	PTP4A1	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1
NM_006908	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
NM_002923	RGS2	Regulator of G-protein signaling 2
NM_002961	S100A4	S100 calcium binding protein A4
NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
NM_003616	SIP1	Survival of motor neuron protein interacting protein 1
NM_005901	SMAD2	SMAD family member 2
NM_005985	SNAIL	Snail homolog 1 (Drosophila)
NM_003068	SNAIL2	Snail homolog 2 (Drosophila)
NM_178310	SNAIL3	Snail homolog 3 (Drosophila)
NM_006941	SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10
NM_003118	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1
NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
NM_012449	STEAP1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1

NM_003200	<i>TCF3</i>	Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
NM_003199	<i>TCF4</i>	Transcription factor 4
NM_006528	<i>TFPI2</i>	Tissue factor pathway inhibitor 2
NM_000660	<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor, beta 1
NM_003238	<i>TGFB2</i>	Transforming growth factor, beta 2
NM_003239	<i>TGFB3</i>	Transforming growth factor, beta 3
NM_003254	<i>TIMP1</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
NM_003692	<i>TMEFF1</i>	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1
NM_178031	<i>TMEM132A</i>	Transmembrane protein 132A
NM_014399	<i>TSPAN13</i>	Tetraspanin 13
NM_000474	<i>TWIST1</i>	Twist homolog 1 (Drosophila)
NM_004385	<i>VCAN</i>	Versican
NM_003380	<i>VIM</i>	Vimentin
NM_033305	<i>VPS13A</i>	Vacuolar protein sorting 13 homolog A (S. cerevisiae)
NM_000638	<i>VTN</i>	Vitronectin
NM_004626	<i>WNT11</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 11
NM_003392	<i>WNT5A</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
NM_032642	<i>WNT5B</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
NM_030751	<i>ZEB1</i>	Zinc finger E-box binding homeobox 1
NM_014795	<i>ZEB2</i>	Zinc finger E-box binding homeobox 2

SUPPLEMENTAL TABLE 2: Complete list of EMT-associated genes used for microarray study

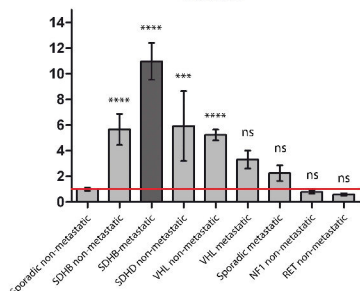
Patient	Date of diagnosis	Age at diagnosis	SDHB mutation	Tumor site	Metastasis sites	Date of death	Date of most recent contact
1	2007	33	c.200+1G>A	APG	-	NA	12/07
2	2003	32	c.268C>T	APG	-	-	Lost to follow-up 09/95
3	1994	36	c.591del	APG	-	NA	Lost to follow-up
4	2007	20	c.166_170del	LA	<i>Suspicion of lung meta</i>	NA	02/11
5	1981	10	c.713del	APG	-	NA	02/12
6	2000	21	c.758G>A	LA	-	NA	11/11
7	2000	31	c.136C>G	LA	-	NA	02/05
8	1996	59	c.203G>A	RA	lymph nodes	NA	12/05
9	1991	29	c.127G>C	APG	lymph nodes, bones, lung & liver	2001	
10	1989	38	c.758G>A	Meta	lymph nodes, lung & liver	1998	
11	1995	24	c.620_621del	APG	lymph nodes & bones	2001	
12	2003	47	c.540+2T>C	APG	other	NA	02/12
13	2000	28	c.137G>A	RA Meta Meta	lymph nodes, bones & liver	2007	
14	2001	28	c.1-?_72+?del	LA	lymph nodes, liver & other	2001	
15	2003	44	c.689G>A	APG	bones	2004	
16	2004	56	c.689G>A	LA	lymph nodes, bones, lung & other	NA	

SUPPLEMENTAL TABLE 3: Clinical characteristics and follow-up of patients with SDHB mutations. Patients 1 to 7 are considered as “non-metastatic”. Patients 8 to 16 are “metastatic”.

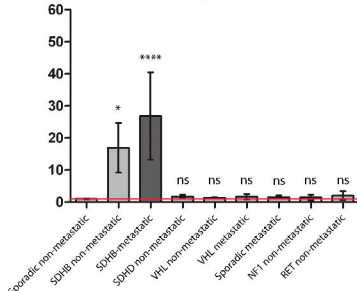
APG: Abdominal paraganglioma; LA: Left adrenal pheochromocytoma, RA: Right adrenal pheochromocytoma. Meta: metastasis.

Relative mRNA expression

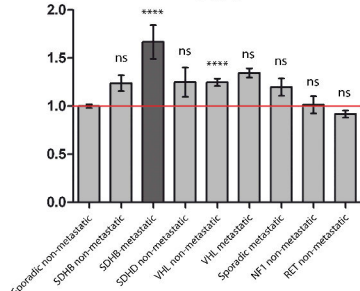
LOXL2



TWIST1

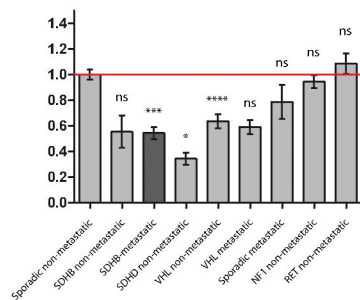


TCF3

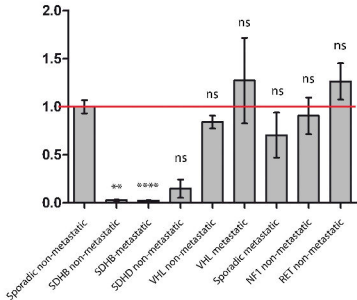


Relative mRNA expression

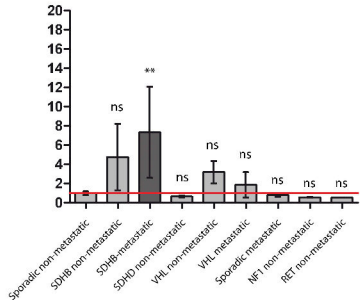
CDH2



KRT19

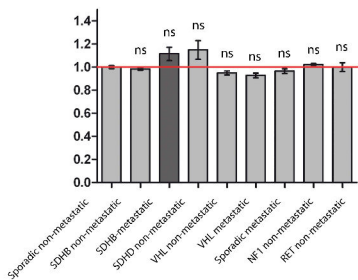


MMP1

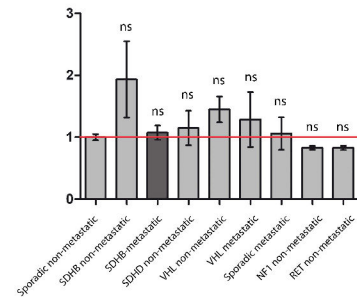


Relative mRNA expression

MMP2



SNAI1



3. Analyses complémentaires, discussion et perspectives

A. L'EMT dans une tumeur neuroendocrine

L'EMT est la voie de signalisation décrite dans le processus de dissémination métastatique des tumeurs épithéliales, qui perdent leurs caractéristiques au profit de marqueurs de types mésenchymateux. Ainsi, il peut paraître inadéquat de parler d'EMT dans le cadre de PCC/PGL, qui se développent aux dépens de cellules neuroendocrines. Cependant comme nous l'avons vu précédemment, les cellules neuroendocrines sont issues de la différenciation des cellules des crêtes neurales, elles ont donc subi à la suite de l'EMT un processus inverse pour perdre ces caractéristiques mésenchymateuses au profit de leurs caractéristiques neuroendocrines. Dans ce contexte particulier, la mise en jeu de différents régulateurs moléculaires de l'EMT dans les cellules neuroendocrines pourrait conduire à la perte de marqueurs des jonctions cellulaires pouvant être différents de la E-cadhérine qui est spécifique des cellules épithéliales et dont nous n'avons pas retrouvé la présence dans les PCC/PGL. Cependant, et considérant la conservation des inducteurs, il est peu probable que les facteurs de transcriptions clés de l'EMT ne soient pas impliqués dans ce processus, appliqué à des cellules non-épithéliales.

a. *La N-cadhérine*

Ainsi, et comme cela a été également décrit dans des tumeurs neuroendocrines pancréatiques [369-371], nous n'avons pas pu mettre en évidence le « switch » de la E-cadhérine vers la N-cadhérine dans les PCC/PGL *SDHB*-malins. En revanche, nous avons observé une sous-expression de la N-cadhérine qui est exprimée dans les PCC/PGL. Etonnamment, la diminution de l'expression de cette protéine impliquée dans l'adhésion focale des cellules s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la T2-cadhérine (CDH10) suggérant peut-être dans les cellules neuroendocrines un « switch » N-cadhérine/T2-cadhérine.

b. *La fibronectine et la vimentine*

Parmi les marqueurs mésenchymateux, la fibronectine et la vimentine sont ceux que l'on retrouve très largement décrits comme induits au cours de la transition des cellules. Dans notre cohorte, nous avons observé une tendance à l'induction transcriptionnelle de la vimentine et de la fibronectine dans les échantillons *SDHB*-malins, comparativement aux autres échantillons malins, mais aussi comparativement aux tumeurs bénignes. Il serait cependant intéressant de vérifier cette tendance en étudiant leur profil d'expression protéique sur des coupes de tissus.

c. *La kératine 19*

Les kératines sont impliquées dans la formation du cytosquelette de filaments intermédiaires. Leur interaction avec le cytosquelette d'actine, ainsi que leur rôle stabilisateur des desmosomes leur confèrent un rôle cellulaire important dans les processus d'adhésion et de mobilité cellulaire. Les cytokératines s'associent toujours en hétérodimères de cytokératines de type I et de type II, ainsi la kératine 19 est en association avec la kératine 8.

La quasi-extinction génique de la kératine 19 au niveau du messager suggérerait que l'étude de son expression protéique pourrait s'avérer être utile pour détecter les tumeurs *SDHB*. Cependant, les analyses immunohistochimiques réalisées sur des échantillons tumoraux ne nous ont pas permis de corrélérer le niveau d'expression de l'ARNm à celui de la protéine. En effet, alors que l'extinction

génique de *KRT19* est retrouvée dans toutes les tumeurs *SDHB*-mutées, nous avons obtenu par immunohistochimie des résultats contradictoires, des tumeurs *SDHB*-mutées pouvant présenter une expression protéique de la kératine 19, et des tumeurs non-*SDHB* mutées présentant une absence d'expression (Figure 42 et Table 17).

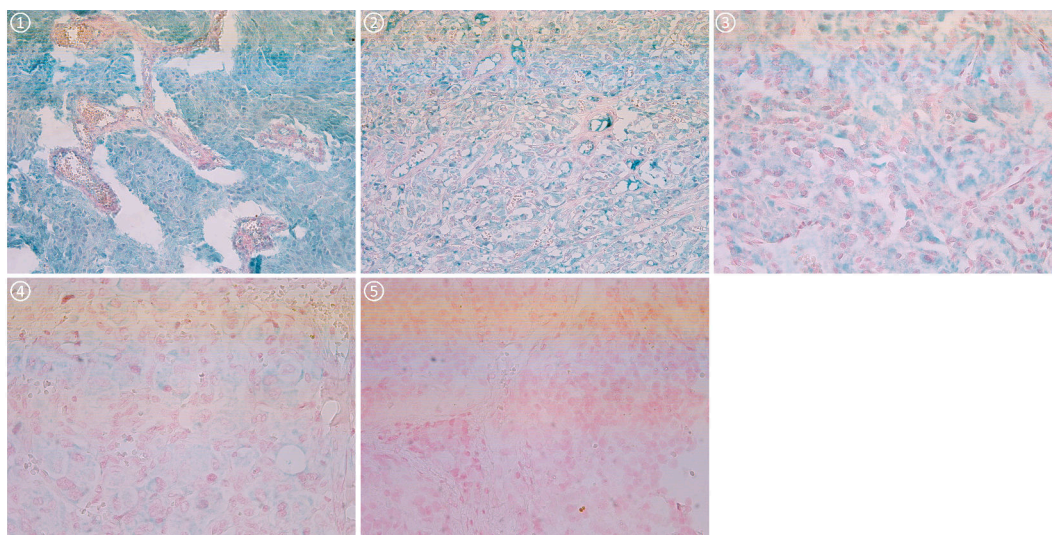


Figure 42 : Immunomarquage KRT19 dans les PCC/PGL.

Exemples des différents types de marquages obtenus, fort (1, 2), modéré (3), faible (4) ou négatif (5).

Immunohistochimie KRT19	Positive	Négative
<i>SDHB</i> -muté*	5/9 (55,6%)	4/9 (44,4%)
<i>SDHB</i> -malin	1/5 (20%)	4/5 (80%)
Autres	91/111 (81,9%)	20/111 (18,1%)
Spécificité		
<i>SDHB</i> -muté*	81,9%	
<i>SDHB</i> -malin	82,6%	
Sensibilité		
<i>SDHB</i> -muté*	44,4%	
<i>SDHB</i> -malin	80%	

Table 17 : Immunohistochimie KRT19, résumé des résultats
* : Bénins + malins

D'une façon intéressante, l'analyse de la survie des patients en fonction du résultat de l'immunomarquage KRT19 révèle une forte association de la survie avec un immunomarquage positif (Figure 43). Cependant, aux vues de la très forte corrélation entre mutations *SDHB* et extinction de la KRT19, il est probable que la mortalité associée à la perte de KRT19 en immunohistochimie soit en réalité le reflet de la mortalité associée aux mutations *SDHB*.

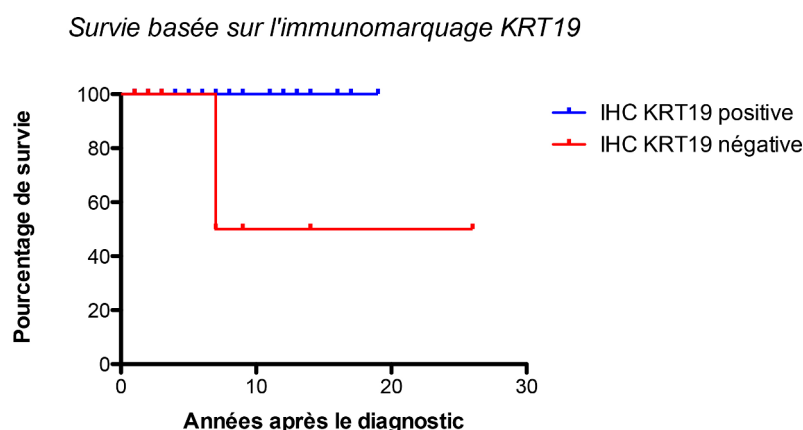


Figure 43 : Analyse de la survie des patients en fonction du résultat de l'immunomarquage KRT19.

B. Les tumeurs au classement discordant

Les 94 gènes associés à l'EMT nous ont permis d'isoler les tumeurs *SDHB*-malignes des autres. Malgré cela, 7 échantillons présentent un classement discordant : 4 *SDHB*-bénins sont classés avec les *SDHB*-malins, et 3 échantillons *SDHB*-malins s'échappent du cluster B.2. Afin de mieux comprendre ces discordances, nous nous sommes intéressés à l'expression ciblée de certains gènes de l'EMT qui semblent importants pour la tumorigenèse *SDHB*-dépendante.

a. *SDHB*-bénins classés dans le cluster B.2

Quatre tumeurs décrites comme *SDHB*-bénignes (S138, S191, S196 et S200) ont été classées parmi les tumeurs présentant une activation de la voie de l'EMT, majoritairement associée aux tumeurs *SDHB*-malignes. Ces tumeurs présentent une induction de *DSP*, *TWIST1*, *CDH10*, et *MMP1* ainsi qu'une diminution de l'expression de *CDH2* et de *KRT19*. En revanche, sans que l'on ne puisse l'expliquer, on ne retrouve pas dans ces échantillons l'induction de *LOXL2*, *TCF3* ou des *MMPs* (Figure 44).

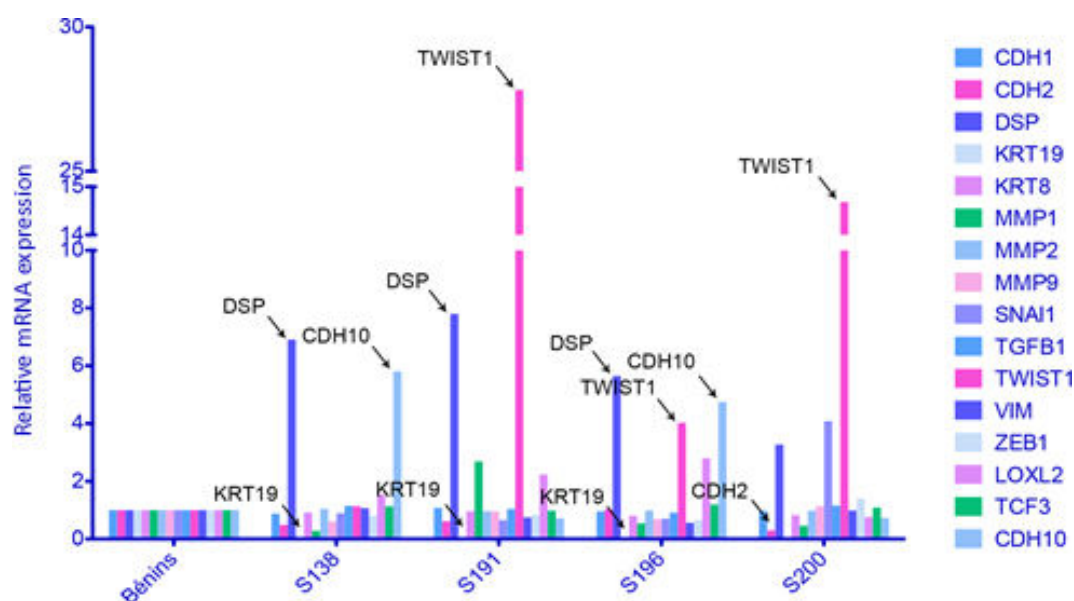


Figure 44 : Profil d'expression des principales cibles de l'EMT chez les patients *SDHB*-bénins du cluster B.2.

Au moment de la publication de ces données, ces 4 patients étaient classés parmi les *SDHB*-bénins. Les données récentes de suivi nous indiquent que le patient S200 est désormais atteint d'une forme maligne de sa maladie, ce qui est cohérent avec son classement ici. Le patient S191, pour lequel les suspicions de malignité étaient importantes (architecture vasculaire typique des tumeurs malignes) a malheureusement été perdu de vue à partir de 2007. Concernant les deux derniers patients (S138 et S196) l'un est à ce jour en rémission complète, tandis que les dernières informations de suivi du dernier patient remontent à 2008. Dans les deux cas qui ont été perdus de vue, il est envisageable qu'il y ait eu une évolution maligne de la maladie.

b. *SDHB-malins non classés dans le cluster B.2*

Les trois échantillons *SDHB*-malins non classés dans ce cluster (S087, S145 et S201) sont des tumeurs primaires, diagnostiquées métastatiques d'emblée ou au cours du suivi.

Malgré la différence de classement, on retrouve dans ces échantillons, une induction de *LOXL2* et de *TWIST1*, une diminution de la *CDH2* et de *KRT19*, ainsi qu'une augmentation de l'expression de *MMP1*, *MMP9* et *CDH10*. Ces quelques arguments bien que peu représentatifs de l'EMT dans sa globalité représentent néanmoins les marqueurs les plus significativement différents, utilisés pour décrire l'EMT dans les échantillons *SDHB*-malins, que l'on retrouve donc également dans ces échantillons (Figure 45).

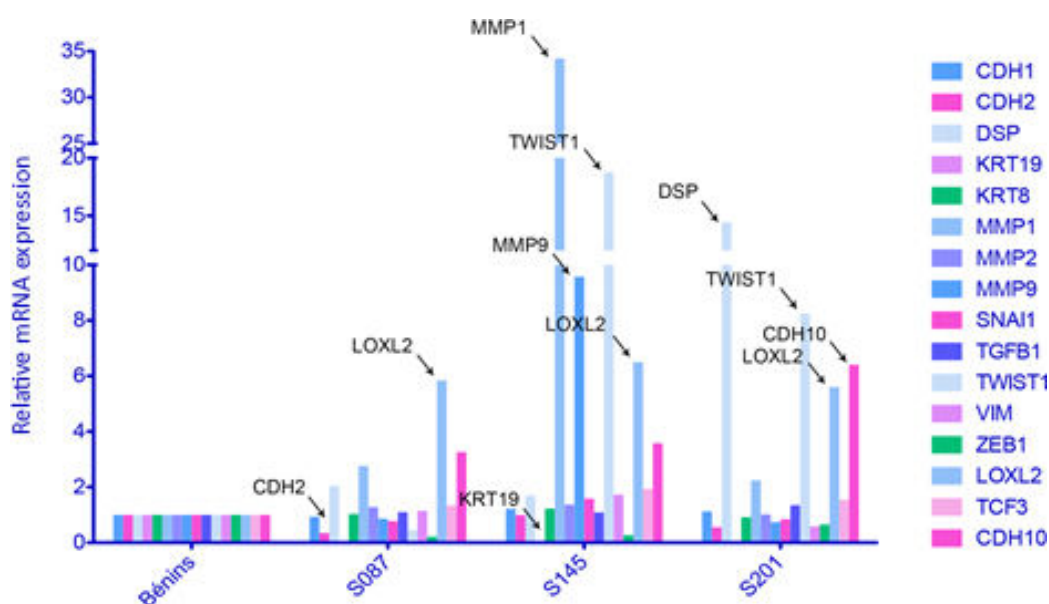


Figure 45 : Profil d'expression des cibles de la TEM chez les patients *SDHB* malins non classés en B.2.

L'un des échantillons correspond à une tumeur primaire (S087) pour laquelle deux métastases (S208 et S209) sont, elles, classées dans le cluster B.2. Ceci aurait pu s'expliquer par la présence au sein de la tumeur primaire d'un nombre limité de cellules ayant un fort potentiel métastatique, qui serait donc masquées par le reste de la tumeur. Cependant il n'existe pas de différences majeures entre les niveaux d'expressions des gènes d'intérêt dans les trois échantillons. En effet à la vue des profils d'expression de ceux-ci, la différence de classement est difficilement explicable (Figure 46).

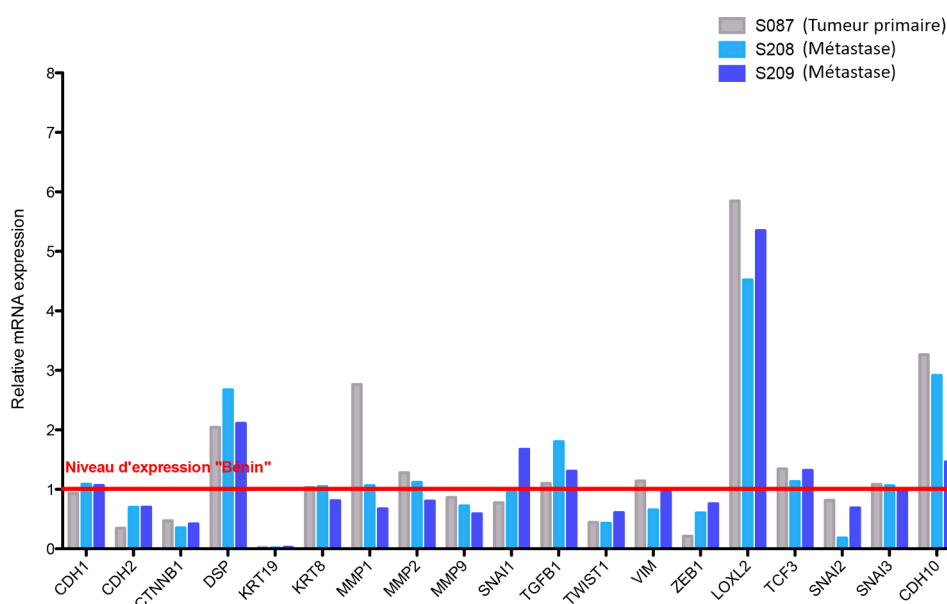


Figure 46 : Profil d'expression des principales cibles de l'EMT dans un trio tumeur primaire/métastases.

C. Localisation nucléaire de SNAIL et activation de l'EMT

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différences d'expression de SNAIL. En revanche nos résultats suggèrent que c'est la régulation de sa localisation qui aurait un rôle dans la régulation de son activité et donc dans la régulation de l'EMT. Toutes les tumeurs *SDHB*-malignes présentent une expression nucléaire de SNAIL, ce qui suggère une forte association entre la rétention nucléaire de la protéine et le statut *SDHB*-malin des patients.

Comme nous l'avons vu précédemment, SNAIL est une protéine instable dont l'expression est très finement régulée. Sa translocation nucléaire et sa rétention au noyau sont des processus faisant intervenir de nombreuses protéines, responsables de modifications post traductionnelles qui permettent son adressage au noyau ou au cytoplasme, sa dégradation ou sa stabilisation. Les découvertes en ce sens sont florissantes, et il n'est pas à exclure que d'autres partenaires impliqués dans la modulation de la localisation de SNAIL existent mais soient encore inconnus à ce jour.

Nos résultats ont mis en évidence un lien majeur, jusque-là non décrit, entre les mutations du gène *SDHB* et la localisation subcellulaire de SNAIL dans les PCC/PGL. Il n'est pas simple de comprendre et d'imaginer le lien ou les interactions pouvant exister entre une protéine mitochondriale (sans autre fonction connue à ce jour), et un facteur de transcription. L'une de mes hypothèses est qu'il existerait une fonction alternative de la protéine *SDHB*, inconnue à ce jour. En effet, c'est le cas chez la levure, organisme chez lequel il a été mis en évidence que l'homologue de la protéine *SDHC* (*Sdh3*) participait à la formation du complexe TIM22 (qui comprend les protéines *Tim18*, *Tim22* et *Tim 54*), un complexe de la membrane mitochondriale interne impliqué dans le transport de protéines mitochondriales synthétisées dans le cytoplasme. *Sdh3* serait ainsi un homologue de *Tim22* et interagirait avec *Tim18* et *Tim 54* pour former un canal nécessaire pour l'import des protéines. Par ailleurs, *Tim18* est un homologue de *Sdh4* (*SDHD*), suggérant un rôle des deux sous unités d'ancrage de la *SDH* dans la formation d'un complexe protéique fonctionnellement complètement différent

[372]. SDHB pourrait avoir un rôle indépendant de son activité au sein de la succinate déshydrogénase, et qui pourrait avoir un lien direct ou indirect avec la régulation de la localisation de SNAIL.

Cette hypothèse pourrait expliquer, au moins en partie, la spécificité des mutations *SDHB* à induire une telle agressivité tumorale, alors qu'elle n'est pas observée chez les patients porteurs de mutations sur les autres gènes *SDHx* (qui ne présentent pas non plus de rétention nucléaire de SNAIL). Cependant, cela ne permettrait pas d'expliquer que certaines tumeurs *SDHB* demeurent bénignes. Il semble donc qu'au-delà de son rôle dans la mitochondrie il est probable qu'il y ait encore de très nombreuses choses à découvrir concernant la protéine SDHB, ses rôles et ses partenaires.

II. RÔLE DE LA MÉTHYLATION DANS LA RÉGULATION DE L'EMT

1. Contexte

La cancérogenèse est un processus complexe, résultant de l'accumulation d'altérations génétiques qui aboutissent à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse, pouvant ensuite acquérir des propriétés invasives. Ces altérations génomiques peuvent être acquises (mutations somatiques) ou héritées (mutations constitutionnelles) ou encore être le fruit de modifications épigénétiques réversibles. La méthylation de l'ADN constitue par exemple une altération épigénétique capable de moduler l'expression des gènes. Dans de nombreux types de cancers, il a par exemple été montré que la méthylation de l'ADN tumoral au niveau des îlots CpG des régions promotrices des gènes était corrélée à la sous expression de ces derniers, expliquant ainsi l'extinction de certains GST [373].

A. Métabolisme, épigénétique et cancer

Les mutations affectant les enzymes du cycle de Krebs impliquées dans la cancérogenèse sont responsables de l'accumulation de métabolites. Ce sont respectivement le succinate et le fumarate, substrats de la SDH et de la FH, et le 2-HG, produit de l'activité néomorphique de l'IDH mutée. Ces trois oncométabolites sont structurellement très proches entre eux, et à l' α -KG.

Parmi la soixantaine d'enzymes dépendantes de l' α -KG, le succinate, le fumarate et le 2-HG ont été décrits ou pourraient être responsables de l'inhibition :

- des prolyl-hydroxylases PHD1 et PHD2, conduisant ainsi à la stabilisation anormale des HIFs en conditions normoxiques, ainsi qu'à une induction transcriptionnelle de leurs gènes cibles associés à l'angiogenèse, au métabolisme, à la prolifération cellulaire, au développement de métastases et à l'apoptose (cf. Figure 47.1). Ce phénomène observé dans des échantillons tumoraux et dans des modèles cellulaires est réversible *in vitro* par supplémentation des cellules en α -KG [144, 374-378].
- de PHD3 (uniquement décrite pour le succinate), qui serait également impliquée dans la dérégulation de l'apoptose développementale de cellules neuroendocrines (cf. Figure 47.2) [238] ;
- des KDMs (ou lysine déméthylases), capables *via* leur domaine JmjC (site actif dépendant de l' α -KG) d'hydroxyler les groupements méthyles des lysines et des arginines des histones H3 et H4 (cf. Figure 47.3) [377, 379, 380] ;
- des TETs (ten-eleven translocation), qui catalysent l'hydroxylation des cytosines méthylées en 5^{ème} position (5meC) en cytosine hydroxyméthylées (5hmeC) (cf. Figure 47.4). Elles sont donc impliquées dans la régulation de la méthylation de l'ADN, notamment au niveau des îlots CpG [377, 380, 381]. L'inhibition des TETs est responsable d'un phénotype dit « hyperméthylateur » dans les tumeurs, décrit dans les gliomes et les leucémies porteurs de mutations somatiques des gènes *IDHx* [380, 381] ;

- des prolyl-hydroxylases du collagène (CPH), responsables de la maturation de celui-ci. Leur inhibition induirait une diminution de la quantité de collagènes matures capables de former de la matrice extracellulaire, ainsi qu'une diminution de l'endostatine, un fragment naturel du collagène mature aux propriétés anti-angiogéniques (*cf.* Figure 47.5) [377].

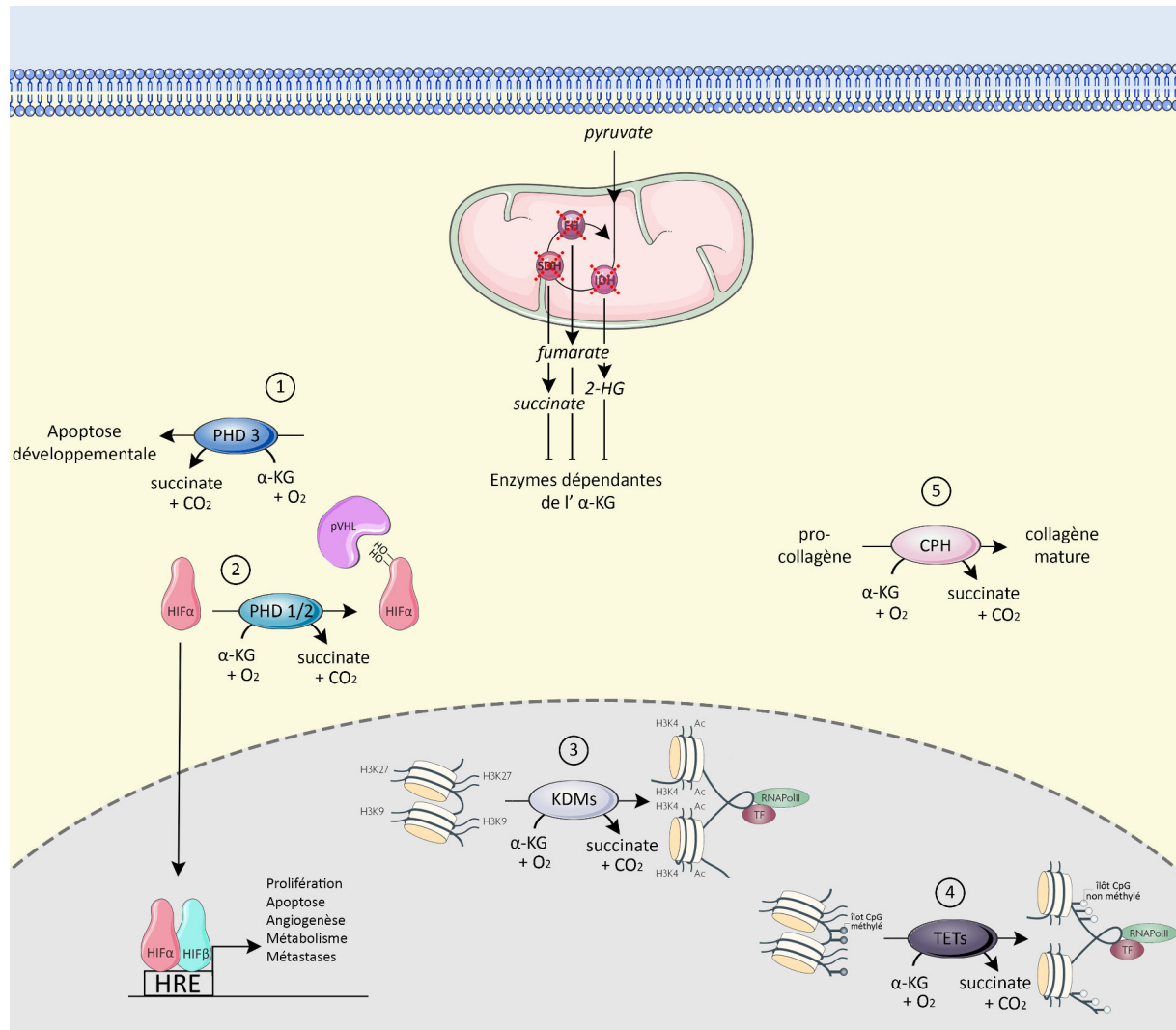


Figure 47 : Tumorigenèse induite par les mutations des gènes codant des enzymes du cycle de Krebs.

Les oncométabolites accumulés : succinate, fumarate et 2-HG sont responsables de l'inhibition des dioxygénases dépendantes de l'α-KG. Ce sont notamment des HIF prolyl-hydroxylases (1,2), des enzymes responsables de la déméthylation des histones (3) et de l'ADN (4), ou encore des enzymes responsables de la maturation des collagènes (5). PHD : prolyl-hydroxylase, HRE : élément de réponse à l'hypoxie, KDM : lysine déméthylase, TET : cytosine déméthylase, CPH : prolyl-hydroxylase du collagène.

B. Les modèles d'étude des PCC/PGL

Dans le cadre de PCC/PGL *SDHB*-mutés, l'étude plus approfondie de l'ensemble de ces processus semble particulièrement intéressante et nécessite l'utilisation de modèles cellulaires ou animaux pertinents, qui permettraient de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de ces modifications, et d'envisager des études précliniques.

a. Les souris génétiquement prédisposées

Il n'existe pas de modèle murin de prédisposition au PCC/PGL *SDHx*-dépendant. En effet, il existe plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées qui sont prédisposées au développement de phéochromocytomes (aucun de ces modèles ne développe de paragangliomes). Il s'agit des souris porteuses d'altérations des gènes *NF1* ou *RET* [382, 383], ainsi que de modifications (Knock-Out ou mutations) des gènes *ErbB2*, *PTEN* ou encore *c-mos*, qui, bien que non associés à la maladie chez l'Homme, sont responsables de PCC chez la souris [384-387]. En revanche, les souris présentant une altération des gènes *VHL*, *SDHB* ou encore *SDHD* ne développent pas de PCC [388-391].

b. Les modèles cellulaires

Il existe une seule publication rapportant le développement d'une lignée cellulaire humaine de PCC, issue de l'immortalisation par la télomérase hTERT de cellules isolées à partir d'un phéochromocytome. Bien qu'elles expriment quelques marqueurs de différenciation neuroendocrine tels que la chromogranine A ou CD56, ces cellules ne présentent pas d'expression des enzymes de la voie de biosynthèse des catécholamines, et n'ont pas d'activité sécrétoire [392].

Il existe par ailleurs trois modèles cellulaires de PCC provenant de rongeurs : les PC12, les MPC et les MTT. Les PC12 sont historiquement les premières à avoir été mises au point, à partir de la mise en culture d'une tumeur spontanée développée chez un rat. Ces cellules expriment toutes les enzymes nécessaires au stockage et à la sécrétion des catécholamines, présentent des granules de sécrétion et sécrètent de la norépinéphrine et de la dopamine. Elles sont notamment très utilisées dans les laboratoires pour l'étude de la différenciation neuronale, car elles ont la particularité de répondre au NGF [393]. Très récemment, il a été décrit que ces cellules présentaient une mutation du gène *MAX*, qui fait partie des nouveaux gènes de prédisposition [199].

Les souris transgéniques présentant une altération génétique hétérozygote du gène *Nf1* développent différents types de tumeurs dont des PPC. La mise en culture d'une de ces tumeurs, par Powers et al. a permis le développement de la lignée cellulaire MPC (mouse pheochromocytoma cells), qui présente des granules de stockage et de sécrétion de catécholamines, et une expression de la PNMT [394]. Plus récemment, la remise en culture d'une tumeur hépatique, développée après injection de MPC dans la veine caudale de souris, a permis de générer une lignée cellulaire agressive, au potentiel métastatique important, qui induit très rapidement des lésions tumorales volumineuses chez la souris, les cellules MTT (Mouse Tumor Tissue-derived). Les lésions résultantes présentent par ailleurs une expression des enzymes TH et PNMT, ainsi que des granules de sécrétion, et des concentrations élevées de catécholamines [395].

Il n'existait pas, jusqu'alors, de modèle cellulaire porteur d'une inactivation complète d'un gène *SDHx*, utilisable pour étudier cette voie de tumorigénèse.

2. Article 2 : L'hyperméthylation associée aux mutations *SDHx*

A. Résumé

Nous avons procédé à une étude globale de la méthylation sur une collection de 145 PCC/PGL provenant de la collection COMETE pour lesquels nous disposons notamment des données

d'expression génique. Les résultats de ce travail ont confirmé l'importance de la génétique dans la tumorigenèse des PCC/PGL, puisque la classification des échantillons tumoraux uniquement basée sur leur profil de méthylation de l'ADN s'est révélée suffisante pour séparer les tumeurs *SDHx*, des tumeurs *VHL* et de toutes les autres (*RET*, *NF1*, *TMEM127*, *MAX* ainsi que les tumeurs sporadiques). Cette classification a révélé un phénotype hyperméthylateur, spécifique des tumeurs porteuses de mutations sur les gènes *SDHx*. L'analyse intégrative des données de méthylation et d'expression génique a révélé une forte corrélation inverse entre le niveau de méthylation des gènes et leur niveau d'expression. Ce phénomène, observé dans toutes les tumeurs *SDHx*, est accentué dans les tumeurs *SDHB*, où l'on retrouve une plus forte méthylation associée à un plus faible niveau d'expression génique. De manière très intéressante, l'un des gènes les plus hyperméthylés (après le gène codant pour la PNMT, cf. Section Introduction, Particularités des tumeurs *SDHB*-dépendantes, Profil sécrétoire), dans les tumeurs *SDHB* comparativement aux autres tumeurs, est le gène *KRT19*. Ainsi, en plus des données transcriptomiques, qui nous ont conduit à mettre en évidence l'activation de l'EMT dans les tumeurs *SDHB*-malignes, les données de méthylome nous permettent d'expliquer l'extinction génique d'acteurs importants de l'EMT dans ces tumeurs.

Dans les tumeurs porteuses de mutations sur les gènes *SDHx*, nous avons observé une diminution des cytosines hydroxyméthylées en 5^{ème} position (5hmeC) et une surreprésentation de la forme triméthylée de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), deux observations qui suggèrent une inhibition des enzymes TETs et KDMs respectivement.

L'ensemble des observations faites sur les échantillons tumoraux humains a ensuite été confirmé dans un modèle de cellules chromaffines déficientes pour le gène *Sdhb* que nous avons généré et qui constitue le premier et le seul modèle cellulaire existant porteur d'un défaut complet en SDH. Ces cellules ont été obtenues en utilisant le système d'inactivation Cre/Lox dans des cellules chromaffines isolées à partir de médullosurrénales de souris génétiquement modifiées (porteuses de sites Lox P de part et d'autre de l'exon 2 du gène *Sdhb*). La caractérisation de ce nouveau modèle d'étude nommé imCC, pour « immortalized mouse chromaffin cells », a été effectuée et nous avons ainsi vérifié que les imCC *Sdhb*^{-/-} présentent une inactivation complète du gène *Sdhb*, qui se traduit par une absence de la protéine, une activité enzymatique SDH nulle, et une accumulation massive de succinate.

L'analyse du méthylome de ces cellules a révélé, comme dans les tumeurs humaines, une hyperméthylation globale de l'ADN des cellules *Sdhb*^{-/-}. Nous avons montré que les cellules *Sdhb*^{-/-} présentaient une augmentation du ratio 5meC/5hmeC comparativement aux cellules contrôles, et que ce phénomène était réversible après un traitement des cellules à l' α -KG. D'autre part, nous avons mis en évidence une augmentation d'expression des formes di et tri-méthylées de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me2, H3K27me3), et de la forme triméthylée de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3).

Par ailleurs, nous avons montré que les cellules *Sdhb*^{-/-} présentaient des capacités migratoires accrues comparativement aux cellules contrôles. L'étude de l'effet d'un traitement déméthylant (5-aza-2'-desoxycytidine (décitabine ou DAC)) a conduit à une réversion du phénotype migratoire des cellules *Sdhb*^{-/-}, et ce sans effet sur les cellules sauvages.

Ces travaux nous ont donc permis de décrire un phénotype hyperméthylateur spécifique des tumeurs *SDHx*, particulièrement accentué dans les tumeurs *SDHB*. Nous avons ainsi mis en évidence que des modifications épigénétiques pouvaient être un mode de régulation de gènes impliqués dans le processus d'EMT spécifique de l'inactivation du gène *SDHB*. Notre modèle cellulaire nous a par

ailleurs conduit à montrer que les propriétés migratoires accrues des cellules *Sdhb*^{-/-} pouvaient être modulées par un traitement déméthylant, suggérant ainsi une réversion possible du phénotype par modulation de la méthylation.

B. Article 2

Letouzé E.*, Martinelli C.*, Lorient C., et al.,

“SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma.”

Cancer Cell. 2013 Jun 10;**23**(6):739-52.

SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma

Eric Letouzé,^{1,13} Cosimo Martinelli,^{2,3,13} Céline Lorient,^{2,3} Nelly Burnichon,^{2,3,4} Nasséra Abermil,^{3,4} Chris Ottolenghi,^{3,6,7} Maxime Janin,^{6,7} Mélanie Menara,^{2,3} An Thach Nguyen,^{2,3} Paule Benit,⁸ Alexandre Buffet,^{2,3} Charles Marcaillou,⁹ Jérôme Bertherat,^{3,10,11,12} Laurence Amar,^{3,5,12} Pierre Rustin,⁸ Aurélien De Reyniès,¹ Anne-Paule Gimenez-Roqueplo,^{2,3,4,12,14} and Judith Favier^{2,3,14,*}

¹Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre Le Cancer, 75013 Paris, France

²INSERM, UMR970, Paris-Cardiovascular Research Center (PARCC), 75015 Paris, France

³Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France

⁴Service de Génétique

⁵Service d'Hypertension Artérielle

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, 75015 Paris, France

⁶Service de Biochimie Métabolique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France

⁷INSERM U747, 75015 Paris, France

⁸INSERM U676, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

⁹IntegraGen, 91030 Evry, France

¹⁰Service des Maladies Endocriniennes et Métaboliques, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Cochin, Centre de Référence Maladies Rares de la Surrénale, 75014 Paris, France

¹¹INSERM U1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France

¹²Rare Adrenal Cancer Network-Cortico Médullosurrénale Tumeur Endocrine, Institut National du Cancer, 75014 Paris, France

¹³These authors contributed equally to this work

¹⁴These authors contributed equally to this work

*Correspondence: judith.favier@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>

SUMMARY

Paragangliomas are neuroendocrine tumors frequently associated with mutations in *RET*, *NF1*, *VHL*, and succinate dehydrogenase (*SDHx*) genes. Methylome analysis of a large paraganglioma cohort identified three stable clusters, associated with distinct clinical features and mutational status. *SDHx*-related tumors displayed a hypermethylator phenotype, associated with downregulation of key genes involved in neuroendocrine differentiation. Succinate accumulation in *SDH*-deficient mouse chromaffin cells led to DNA hypermethylation by inhibition of 2-OG-dependent histone and DNA demethylases and established a migratory phenotype reversed by decitabine treatment. Epigenetic silencing was particularly severe in *SDHB*-mutated tumors, potentially explaining their malignancy. Finally, inactivating *FH* mutations were identified in the only hypermethylated tumor without *SDHx* mutations. These findings emphasize the interplay between the Krebs cycle, epigenomic changes, and cancer.

INTRODUCTION

Paragangliomas (PGL) are neural crest-derived tumors that arise from parasympathetic ganglia of the head and neck region or

from sympathetic ganglia located in the thorax, abdomen, or pelvis. These tumors may develop in the adrenal medulla, in which case they are called pheochromocytomas (PCC) (Lenders et al., 2005). There has been extensive genetic characterization

Significance

Unexpected links between epigenetic and genetic alterations were recently identified with the demonstration that *IDH* mutations impair DNA demethylation in gliomas. Mutations affecting succinate dehydrogenase (*SDH*), another tricarboxylic acid cycle enzyme, have been identified in several cancers and are particularly frequent in paragangliomas. With this genome-wide analysis of DNA methylation changes in a large paraganglioma cohort, we demonstrate that *SDHx*, and particularly *SDHB*-related metastatic tumors, display a hypermethylator phenotype, associated with downregulation of key genes implicated in chromaffin cell differentiation. These findings explain the oncogenic effect of *SDH* inactivation and the invasiveness of *SDHB*-mutated tumors and raise the possibility of innovative epigenetic therapies involving DNA demethylating agents for these cancers.

of PGL/PCC. At least 30% of patients harbor a germline mutation in one of the ten identified susceptibility genes (Gimenez-Roqueplo et al., 2012): *RET*, *NF1*, *VHL*, *SDHAF2*, *TMEM127*, or *MAX*, and in genes encoding the four subunits of succinate dehydrogenase (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, or *SDHD*, referred to as *SDHx* genes). Integrated genomic analysis of the largest available cohort of PGL/PCC, recruited by the French COMETE network, identified homogeneous molecular subgroups associated with susceptibility genes (Burnichon et al., 2011) and showed that a large proportion of sporadic PGL/PCC carry a somatic mutation in *VHL*, *RET*, *NF1*, *MAX*, or *HIF2A* genes (Burnichon et al., 2011, 2012a, 2012b; Favier et al., 2012). Overall, 60% of cases harbor a somatic or germline mutation in a known predisposing gene.

Various important issues remain to be unraveled, including the oncogenic role of *SDHx* mutations. Succinate dehydrogenase was the first mitochondrial enzyme to be identified as a tumor suppressor in familial PGL (Baysal et al., 2000). Its inactivation also predisposes to renal cell carcinoma (Ricketts et al., 2008) and gastrointestinal stromal tumors (Janeway et al., 2011). To date, the only mechanism linking SDH to cancer involves hypoxia-inducible factors (HIFs) (Dahia et al., 2005; Gimenez-Roqueplo et al., 2001). SDH dysfunction results in the accumulation of succinate (Pollard et al., 2005), its tricarboxylic acid cycle (TCA) substrate, which acts as a competitive inhibitor of the 2-oxoglutarate (2-OG)-dependent HIF prolyl-hydroxylases (Brière et al., 2005; Selak et al., 2005). This stabilizes HIF- α and activates genes that facilitate angiogenesis and anaerobic metabolism. However, the exact role of HIFs in oncogenesis remains unclear (Young and Simon, 2012). Understanding SDH-related tumorigenesis is crucial, because the presence of a germline mutation in the *SDHB* gene is a major risk factor of malignancy and of poor prognosis. Around 40% of all patients with a metastatic form of the disease harbor an *SDHB* mutation (Pasini and Stratakis, 2009). *SDHB*-mutation carriers have a 19-fold higher risk of developing a metastatic disease (Gimenez-Roqueplo et al., 2003) and shorter survival than patients with a malignant PGL/PCC but without *SDHB* mutations (Amar et al., 2007).

DNA methylation changes are hallmarks of human cancers (Hanahan and Weinberg, 2011). Cancer cells often display overall DNA hypomethylation and hypermethylation of promoter CpG islands, resulting in the transcriptional silencing of tumor suppressor genes (Jones and Baylin, 2007). Unlike genetic mutations, DNA methylation is a reversible process and is thus a promising target for drug development (Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011). These epigenetic features are also useful as biomarkers for early detection of cancer in blood samples, for prognosis, or for prediction of response to treatment (Laird, 2003). Genome-scale DNA methylation profiling has allowed the identification of epigenetic subtypes in several cancers (Hinoue et al., 2012; Noushmehr et al., 2010). A CpG island methylator phenotype (CIMP), characterized by the concerted hypermethylation of a large number of genes, was initially described in colorectal cancer (Toyota et al., 1999) and was recently identified in glioma (G-CIMP; Noushmehr et al., 2010). In glioma, the G-CIMP phenotype is associated with gain-of-function mutations in *IDH1* and *IDH2* that confer to these enzymes a neomorphic capacity to convert α -ketoglutarate (α -KG, or 2-OG) into the oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG). 2-HG acts as a

competitive inhibitor of 2-OG-dependent dioxygenases, including histone demethylases and the TET family of 5-methylcytosine (5-mC) hydroxylases, leading to genome-wide DNA methylation alterations (Xu et al., 2011). Succinate also can inhibit these enzymes in vitro, suggesting that SDH-related tumorigenesis may involve epigenetic alterations (Xiao et al., 2012). However, DNA methylation changes of only a limited number of genes have been investigated so far in PGL/PCC (Geli et al., 2008) and have not been compared with expression data or mutational status.

Here, we report the genome-scale methylome and transcriptome profiling of the well-annotated COMETE cohort and investigate the relationship between *SDHx* mutations and DNA methylation changes in a mouse model of SDH-related paraganglioma.

RESULTS

DNA Methylation-Based Classification of Pheochromocytomas and Paragangliomas

We determined DNA methylation profiles of 145 pheochromocytomas and paragangliomas using the Illumina Infinium HM27 DNA methylation assay, which assesses the degree of methylation of 27,578 CpG sites in promoter regions of 14,495 protein-coding genes (Bibikova et al., 2009). Gene expression was previously characterized in most of these samples (Burnichon et al., 2011), and the mutation status of the main genes predisposing to PGL/PCC (*SDHx*, *VHL*, *NF1*, *RET*, *TMEM127*, and *MAX*) was analyzed (Table S1 available online). As previously described (Hinoue et al., 2012), we excluded probes that might be unreliable and probes designed for sequences on sex chromosomes. We selected the 10% most variant probes, according to the standard deviation of the beta values, and performed consensus clustering (Monti et al., 2003) to identify DNA methylation clusters. The optimal classification defined three tumor subgroups (Figure 1A; Figure S1). Tumors of the M1 cluster displayed concerted hypermethylation at a large number of loci (Figure 1B), reminiscent of the CpG island methylator phenotypes described in colorectal cancer and glioblastoma.

For comparison, we applied a second clustering approach, the recursively partitioned mixture model (RPMM; Houseman et al., 2008), to our data set. Cluster assignments using consensus clustering and RPMM were strongly correlated ($p = 9.7 \times 10^{-39}$), with the two methods agreeing on cluster membership for 90% (130/145) of the tumors (Figure S1F). In particular, the M1 cluster was similarly identified by the RPMM approach, with only 1/17 samples misclassified. We based our subsequent analyses on the consensus clusters, which showed better association with clinical criteria.

We next sought to characterize DNA methylation changes in each cluster. We analyzed probes located within and outside CpG islands separately (Takai and Jones, 2002). Most CpGs within CpG islands are demethylated in normal tissues and undergo hypermethylation in tumors (Jones and Baylin, 2007), whereas CpGs outside CpG islands are mostly highly methylated in normal tissues and undergo loss of DNA methylation in cancers (Feinberg and Vogelstein, 1983). Because of the difficulty in obtaining samples of normal adrenal medulla, only three normal controls were available, hence the comparison with tumor clusters had limited power. After FDR adjustment,

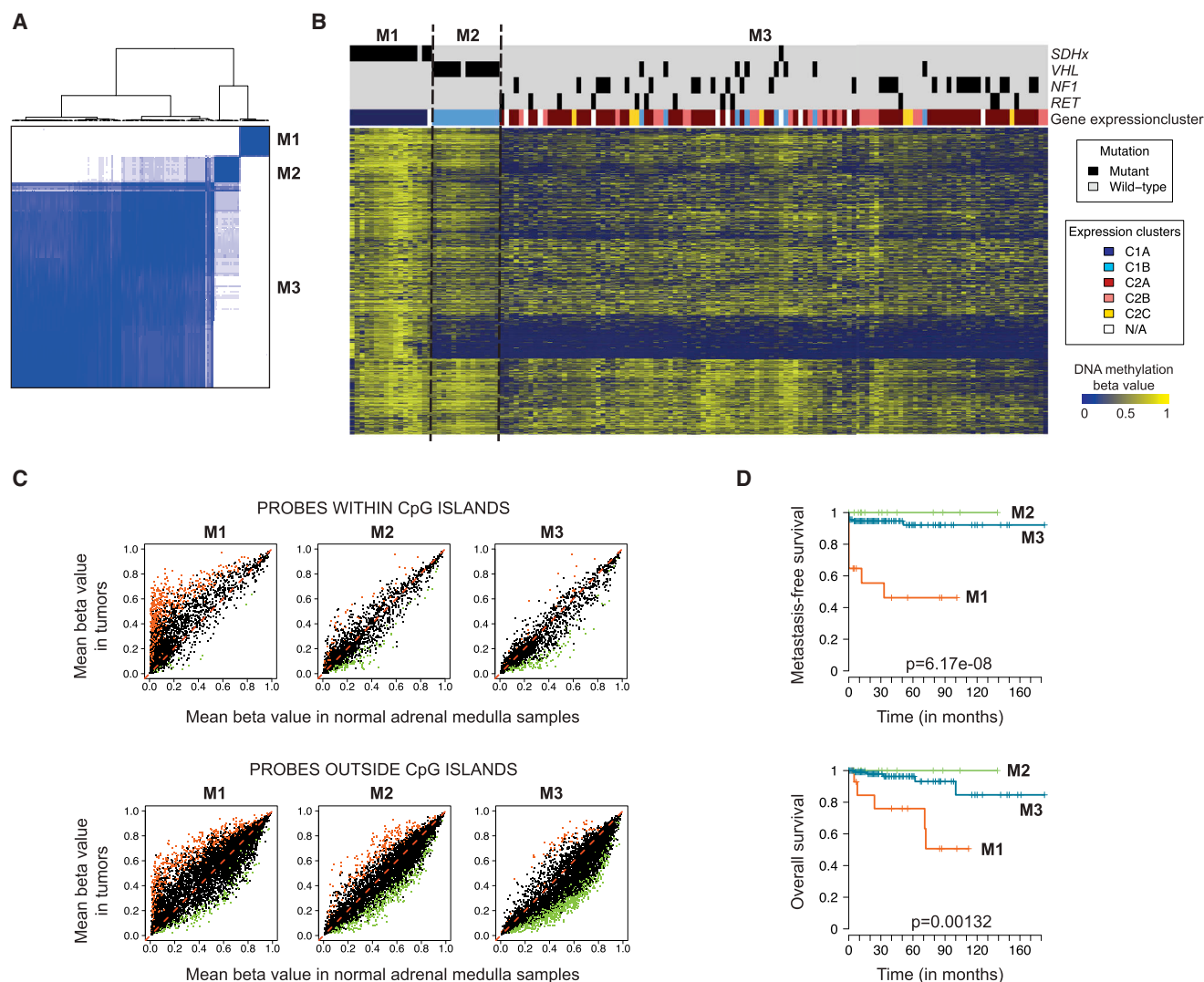


Figure 1. Genome-wide DNA Methylation Profiling of PGL/PCC Identifies a Hypermethylator Phenotype Associated with *SDHx* Mutations

(A) Unsupervised classification of 145 PGL/PCC samples (see Table S1) identifies three stable DNA methylation clusters. The consensus matrix represents the similarity between tumors. Consensus index values range from zero (highly dissimilar profiles, white) to one (highly similar profiles, dark blue). Samples are ordered on the x and y axes by the consensus clustering, which is depicted atop the heatmap. See also Figure S1.

(B) Heatmap representation of DNA methylation profiles. The degree of DNA methylation (beta value) for each probe (row) in each sample (column) is represented with a color scale (dark blue, nonmethylated; yellow, methylated). Tumors are ordered by methylation cluster. Probes are arranged by similarity, as assessed by hierarchical cluster analysis. The mutation status of the main genes predisposing to PGL/PCC (*SDHx*, *VHL*, *NF1*, and *RET*) is indicated above the heatmap, together with expression cluster memberships as determined in a previous study (Burnichon et al., 2011).

(C) Scatterplots comparing methylation levels between tumor subgroups and normal adrenal medulla controls are shown for probes located within (top) or outside (bottom) CpG islands (Takai-Jones definition [Takai and Jones, 2002]). Probes significantly hyper- or hypomethylated in tumors ($p < 0.01$) are indicated in red and green, respectively. See also Table S2.

(D) Kaplan-Meier curves for metastasis-free survival and overall survival.

significant methylation differences between tumors and normal controls were only detected in cluster M1 (1,015 probes with FDR-adjusted $p < 0.05$). However, the number of significant tests ($p < 0.01$) was substantially higher than expected by chance in each cluster (8.7%, 4.8%, and 6.4% in M1, M2, and M3, respectively). Cluster M1 tumors displayed a hypermethylation phenotype, characterized by high methylation levels at a large number of CpG sites, both within (7.2% of probes, $p < 0.01$; Figure 1C; Table S2) and outside (7.0%) CpG islands. Clusters M2 and

M3 did not display substantial hypermethylation within CpG islands, but a strong hypomethylation outside CpG islands was observed in both clusters, particularly in cluster M3 (5.9% of probes hypomethylated in M2, 9.6% in M3).

Association with Genomic and Clinical Features

DNA methylation clusters were highly associated with mutational status ($p = 3.3 \times 10^{-33}$) and gene expression clusters ($p = 1.3 \times 10^{-41}$) (Figure 1B; Table 1). In particular, the hypermethylation

Table 1. Clinical and Genomic Characteristics of DNA Methylation Consensus Clusters

	Overall (n = 145)	Cluster M1 (n = 17)	Cluster M2 (n = 14)	Cluster M3 (n = 114)	p Value
Gender					
Female	93 (64%)	11 (65%)	6 (43%)	76 (67%)	0.22
Male	52 (36%)	6 (35%)	8 (57%)	38 (33%)	
Age					
Median	44	32	25.5	47	1.80×10^{-7}
Range	7–82	10–63	10–49	7–82	
Histology ^a					
Paranglioma	15 (10%)	9 (56%)	1 (7%)	5 (4%)	1.51×10^{-9}
Pheochromocytoma	129 (90%)	7 (44%)	13 (93%)	109 (96%)	
Mutational Status					
<i>SDHx</i>	17 (12%)	16 (94%)	0	1 (1%)	3.32×10^{-33}
<i>VHL</i>	21 (14%)	0	13 (93%)	8 (7%)	
<i>NF1</i>	30 (21%)	0	0	30 (26%)	
<i>RET</i>	13 (9%)	0	0	13 (11%)	
Other	64 (44%)	1 (6%)	1 (7%)	62 (54%)	
Expression Cluster ^a					
C1A	16 (12%)	16 (100%)	0	0	1.33×10^{-41}
C1B	22 (16%)	0	14 (100%)	8 (8%)	
C2A	67 (50%)	0	0	67 (64%)	
C2B	22 (16%)	0	0	22 (21%)	
C2C	7 (5%)	0	0	7 (7%)	

Clinical and genomic features are indicated for each DNA methylation cluster, in absolute numbers and as a percentage of each group size. p values are obtained by chi-square tests for qualitative variables and ANOVA for age.

^aHistology could not be determined for one patient with both abdominal paraganglioma and adrenal pheochromocytoma at first presentation. Gene expression data were available for 134 samples.

phenotype was strongly associated with *SDHx* mutations. In cluster M1, 16/17 tumors were SDH-related (1 *SDHA*, 11 *SDHB*, 1 *SDHC*, and 3 *SDHD* germline mutations), and one was sporadic. Cluster M2 included 13/21 *VHL*-related tumors and one sporadic tumor. All *RET* and *NF1*-related samples were members of cluster M3, together with the remaining sporadic and *VHL*-mutated samples. Clusters M1 and M2 corresponded to the previously described C1A (*SDHx*-related) and C1B (*VHL*-related) expression clusters (Burnichon et al., 2011), and the M3 cluster comprised all tumors of the C2 (*RET/NF1*-related) expression cluster, plus eight tumors from the C1B group. Age at diagnosis and histology, which are known to be associated with mutational status (Amar et al., 2005; Neumann et al., 2002), differed significantly between DNA methylation clusters ($p = 1.8 \times 10^{-7}$ and $p = 1.5 \times 10^{-9}$, respectively). The median age at diagnosis was younger for clusters M1 (32 years) and M2 (25.5 years) than for cluster M3 (47 years), and cluster M1 was enriched in paragangliomas (56% versus $\leq 7\%$ in clusters M2 and M3). Note that only SDH-related paragangliomas displayed a hypermethylation phenotype. Hypermethylation is thus specifically associated with *SDHx* mutations, rather than a characteristic of extra-adrenal tumors. Methylation clusters were significantly associated with both metastasis-free survival (MFS, $p = 6.2 \times 10^{-8}$) and overall survival (OS, $p = 0.0013$), with the prognosis being much worse for M1 tumors than M2 and M3 tumors (Figure 1D). However, the presence of an *SDHB* mutation predicted prognosis more significantly than

methylation cluster membership in our series ($p = 8.9 \times 10^{-10}$ and $p = 8.2 \times 10^{-6}$ for MFS and OS, respectively).

Sdhb Knockout in Mouse Chromaffin Cells Establishes a Hypermethylator Phenotype and Promotes Cell Migration

To investigate the mechanisms linking SDH deficiency with methylation, we generated an immortalized mouse chromaffin cell (imCC) line harboring a complete defect in SDH. We created genetically modified mice in which the endogenous *Sdhb* exon 2 is flanked by LoxP sites, isolated chromaffin cells from their adrenal medulla, and deleted *Sdhb* by Cre-mediated recombination (Figure 2A). Suppression of exon 2 leads to a premature stop codon and to the predicted translation of a truncated 33 amino-acids protein, instead of the 283 amino-acids wild-type (WT) SDHB protein. Two independent *Sdhb*^{−/−} clones were studied (c6 and c8). As previously reported for human tumors (Favie et al., 2009; van Nederveen et al., 2009), *Sdhb*-deficient cells completely lost SDHB protein production but had normal SDHA levels (Figure S2A). They displayed a selective loss of SDH/succinate cytochrome c reductase (SCCR) activity (Figures 2B, S2B, and S2C), accompanied by large increases in both intracellular (Figure 2C) and secreted (Figure S2D) succinate levels and abnormally small amounts of the following organic acids (fumarate and malate) produced by the TCA cycle. Expression and nuclear translocation of HIF2 α were also higher than in controls (Figures S2E).

We used reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) (Meissner et al., 2005) to examine base-pair resolution DNA methylation patterns in two samples of WT cells and in both *Sdhb*^{−/−} clones. We obtained more than 15 million high-quality aligned reads per sample, yielding quantitative DNA methylation data for 1,530,785 CpG dinucleotides (coverage ≥ 10 reads in each sample). Hierarchical clustering identified two clusters corresponding to WT and *Sdhb*^{−/−} cells (Figure 2D). Like SDHx-related tumors, *Sdhb*-deficient cells displayed a widespread hypermethylation both within and outside CpG islands (Figure 2E). We obtained DNA methylation rates with more than ten individual CpG measurements for 78% of CpG islands ($n = 12,503$). CpG island methylation rates were highly correlated between the two WT samples and between the two *Sdhb*^{−/−} clones (Figure S2F). By contrast, 3,357 CpG islands were significantly hypermethylated, and 242 were significantly hypomethylated in *Sdhb*^{−/−} clones as compared to WT cells (FDR-adjusted $p < 0.05$ and absolute methylation difference $> 5\%$) (Figure S2G). Genes hypermethylated in *Sdhb*-deficient imCCs significantly overlapped those hypermethylated in SDH-related PGL/PCC ($p = 3.2 \times 10^{-170}$), with 1,014 genes in common (Figure 2F; Table S3).

Although SDH-deficiency led to a mean 2-fold decrease in growth rate (Figure S2H), *Sdhb*^{−/−} cells had marked increased migration capacities as assessed in a wound healing scratch assay (Figure 2G). These characteristics are consistent with the known specificities of *SDHB*-related PGL/PCC, which are not associated with increased proliferation but are associated with invasiveness. To investigate the role of DNA methylation in this phenotype, we treated *Sdhb*^{−/−} cells for 72hr with low (10 nM) or higher (5 μ M) doses of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine or DAC), an epigenetic modifier that inhibits DNA methyltransferase activity. High doses induced cytotoxicity in all cell types (from 10% to 25% of cell death after 3 days), which was markedly reduced at low doses (cell death $< 8\%$). After drug withdrawal, the effect of DAC was assessed on cell proliferation and migration. We observed a dose-dependant blockade of cell growth in both WT and *Sdhb*^{−/−} cells (Figure S2H). In contrast, an inhibition of collective cell migration was specifically observed in SDH-deficient cells, but not in WT cells (Figure 2H).

SDH-Deficient Chromaffin Cells Display Increased 5-mC/5-hmC Ratio and Histone Methylation

Tet-mediated conversion of 5-mC to 5-hmC was evaluated by flow cytometry and immunofluorescence analyses: there was more 5-mC in *Sdhb*^{−/−} than the WT imCCs (Figures 3A and 3B). This effect was reversed by the addition of 2-OG to the culture medium, which also led to an increase in 5-hmC staining of *Sdhb*^{−/−} cells (Figure S3A). The methylation of lysines 9 and 27 of histone 3 was then assessed by western blotting. Loss of *Sdhb* increased H3K9me3, H3K27me2, and H3K27me3 levels (Figure 3C, quantified in Figure S3B). As both H3K9 and H3K27 methylation are closely linked with DNA methylation (Cedar and Bergman, 2009), these effects on histone methylation may contribute to the establishment of the hypermethylator phenotype.

To confirm the inhibition of oxidative demethylation by succinate in human PGL/PCC, we first measured succinate and fumarate concentrations in a subset of tumor samples and confirmed

a mean 100-fold increase in succinate levels in *SDHx*- versus non-*SDHx*-mutated PGL/PCC (Table S4). We next used immunohistochemistry to quantify 5-mC and 5-hmC, as well as H3K9me3 and H3K27me3, in 39 paraffin-embedded tumor samples with various genetic backgrounds. All (16/16) *SDHx*-mutated tumors had low 5-hmC levels, whereas 70% (16/23) of non-SDH samples had high levels of 5-hmC (Figure 3D; Table S5). Similarly, 81% of SDH-related PGL/PCC displayed abundant H3K27me3, whereas 43% of non-SDH tumors displayed low H3K27me3 levels (Figure 3E; Table S5). Succinate inhibition of oxidative demethylation by TET proteins and Jumonji domain-containing histone demethylases may thus be the mechanism responsible for the accumulation of DNA methylation in SDH-deficient tumors.

Transcriptional Changes Associated with the Hypermethylator Phenotype

To better understand the impact of DNA hypermethylation in tumors of the M1 cluster, we examined the relationship between methylation and expression changes in these tumors. Principal component analysis indicated that the transcriptome differed between the DNA methylation subgroups (Figure 4A), consistent with the strong association between methylation and expression clusters. Of the 7,136 CpG sites that were differently methylated in M1 and non-M1 tumors (FDR-adjusted $p < 0.05$), 6,850 (96%) were hypermethylated in M1 tumors, resulting in a highly asymmetric volcano plot (Figure 4B). The transcriptome data, available for 134/145 samples, revealed a similar asymmetry (Figure 4C), with 623 genes significantly downregulated (FDR-adjusted $p < 0.05$) and 356 genes significantly upregulated in cluster M1 (Table S6). Integrated transcriptome and methylome analysis revealed that 11.5% of genes with significant hypermethylation in M1 tumors (FDR-adjusted $p < 0.05$ and beta value difference > 0.1) also showed more than a 2-fold reduction in gene expression and that the mean shift in expression values correlated with the amplitude of the methylation difference (Figure 4D). To gain a more comprehensive view of DNA methylation changes in M1 tumors, we reanalyzed 22 tumors (ten M1, two M2, and ten M3) using the Illumina Infinium 450K assay, which assesses the methylation levels of more than 485,000 CpG sites. Using probes present on both the 27K and 450K arrays, we verified that the beta value differences between M1 and non-M1 tumors were consistent in the two data sets (mean absolute difference = 0.023). Overall, we identified 4,663 genes with significant hypermethylation of their promoter CpG islands (Table S7). The overlap between the lists of hypermethylated and downregulated genes was highly significant ($p = 1.5 \times 10^{-7}$), with 191 genes showing both significant CpG island hypermethylation and significant downregulation in M1 tumors (Table S8). Gene ontology analysis of this set of genes showed a significant enrichment in terms associated with neuroendocrine differentiation (Table S9). Several genes are associated with catecholamine metabolic process [*PNMT* (Figure S4), *DRD2*, and *SULT1A1*], transport (*SLC6A2*), or secretion (*NPY*); *RET* and *NRP2* are implicated in the differentiation of neural-crest cells. *RBP1* is a tumor suppressor known to be epigenetically silenced in several cancers (Esteller et al., 2002). Downregulation of *SPOCK2*, an inhibitor of matrix-metalloproteases, of *KRT19* (Figure S4), a key marker of the epithelial-to-mesenchymal transition

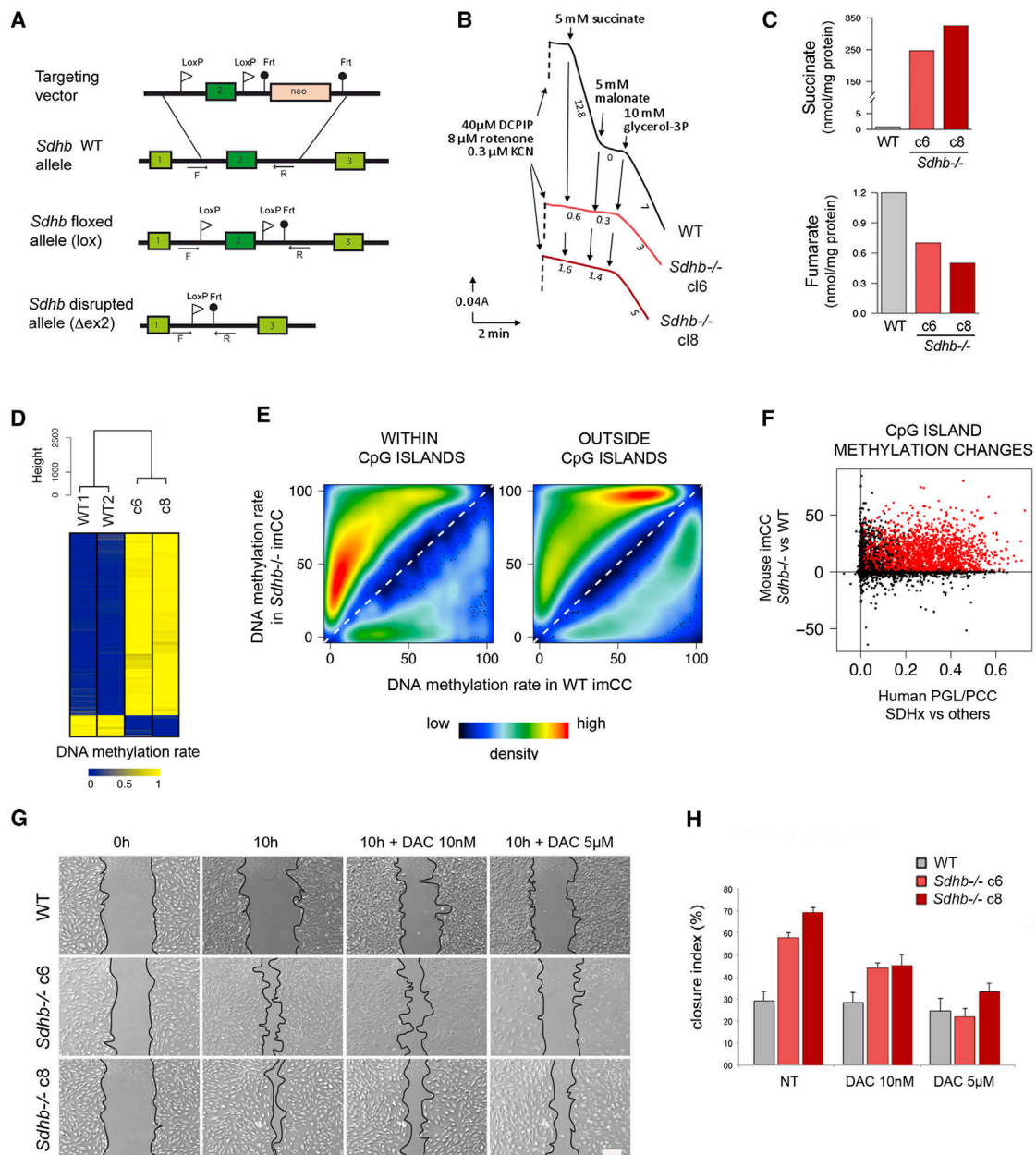


Figure 2. Generation and Characterization of *Sdhb*-Deficient Mouse Chromaffin Cells

(A) Strategy used for the generation of *Sdhb* knockout in mouse. The targeting vector comprises mouse *Sdhb* exon 2 locus flanked with LoxP sites and followed by a Neomycin (neo) resistance cassette flanked with Frt sites, which is removed after Flip-mediated recombination between the Frt sites. Primers for genotyping (arrows) are indicated below their target sequences.

(B) SDH activity in WT cells (black) measured by 2,6-dichlorophenol-indophenol reduction (in the presence of rotenone, inhibitor of complex I, and cyanide, inhibitor of complex IV) is triggered by succinate addition and subsequently inhibited by adding malonate, a specific SDH inhibitor. The subsequent addition of glycerol-3P triggers the activity of the mitochondrial glycerol-3P dehydrogenase in the same sample. Similar assays were carried out on *Sdhb*^{-/-} c6 (light red) and c8 (dark red) imCCs. Numbers along the traces are nmol/min per mg protein.

(C) Gas chromatography-mass spectrometry analysis of organic acids revealing a substantial accumulation of succinate and the depletion of fumarate in *Sdhb*^{-/-} cells relative to controls.

(D) Hierarchical clustering analysis of DNA methylation profiles from four mouse chromaffin cell samples, with (c6 and c8 clones) or without (WT1 and WT2) a knockout of *Sdhb* gene, analyzed by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). A heatmap indicates the degree of methylation of the 500 most variant CpG sites in each sample (dark blue, nonmethylated; yellow, methylated).

(E) Smoothed color density representation of the scatterplots representing DNA methylation changes between WT and *Sdhb*^{-/-} imCCs, within (left) and outside (right) CpG islands. Only CpG sites showing significantly different methylation rates between WT and *Sdhb*^{-/-} cells are represented.

(F) Comparison of DNA methylation changes in SDH-related human PGL/PCC and *Sdhb*^{-/-} imCCs. CpG island methylation rates were calculated for all mouse/human gene homologs represented in Illumina methylation arrays and RRBS data. Each point represents a gene, with the CpG island methylation difference (legend continued on next page)

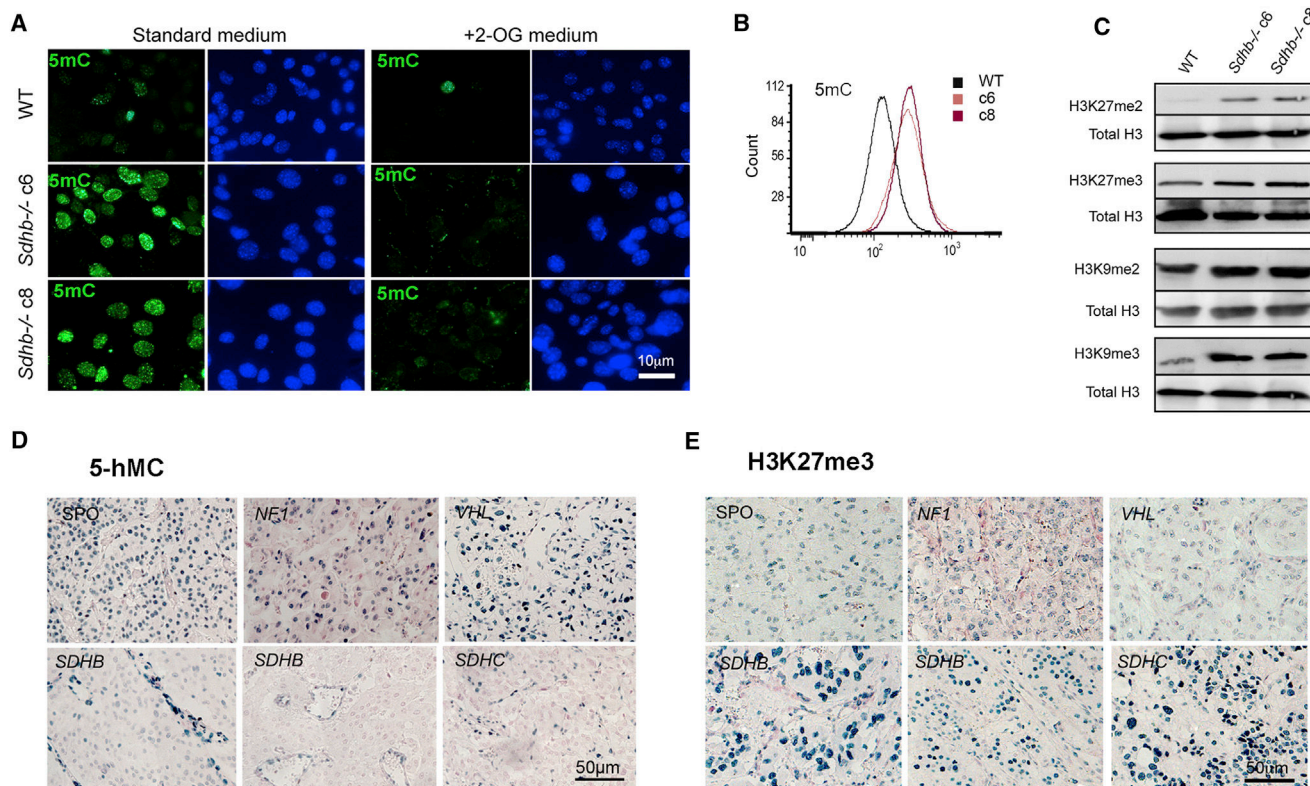


Figure 3. Functional Consequences of SDH Inactivation on Oxidative Demethylation

(A) Immunofluorescence showing a larger number of 5-mC-positive nuclei in *Sdhb*^{-/-} clones. Addition of 2-OG to the culture medium reversed this phenotype. Scale bar = 10 μm.

(B) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis also showed that *Sdhb* knockout leads to an increase in 5-mC in imCCs.

(C) Histone lysine methylation levels were assessed by western blotting with specific antibodies. Total H3 was used as a loading control.

(D) 5-hmC levels were studied on human PGL/PCC with various genetic backgrounds. Strong immunostaining of endothelial cell nuclei was observed in all tumor types, whereas the tumor cell staining was weaker in *SDHx*-mutated tumors. Scale bar = 50 μm.

(E) H3K27me3 levels are shown for tumors with various genetic backgrounds. Scale bar: 100 μm; SPO: sporadic tumor. See also Figure S3 and Tables S4 and S5. Scale bar = 50 μm.

(EMT) and of *DNAJA4*, recently shown to be a metastasis suppressor gene (Pancheva et al., 2012), may participate to the invasive phenotype of SDH-deficient cells. These findings indicate that methylome remodeling results in major transcriptional abnormalities in SDH-related tumors, directly associated with their phenotypic characteristics.

Exome Sequencing of the Only Hypermethylated Sample without *SDHx* Mutation Identified Inactivating Mutations in the *FH* Gene

A single tumor in our data set (HS_121) carried no *SDHx* mutation but displayed a hypermethylator phenotype (Figure 1B) as well as both low 5-hmC and high H3K9 and H3K27 methylation (Table S5). This tumor, which also belonged to the C1A (*SDH*-related) expression cluster was a local recurrence of an adrenal pheo-

chromocytoma resected from a 63-year-old female presenting a high level of urinary normetanephrines. To explain this “SDH-like” phenotype, we performed the whole-exome sequencing of tumor and matched blood DNA. We identified 21 nonsynonymous somatic mutations effecting exons or splice sites in this tumor, 16 of which were predicted to have functional consequences (Table S10). In particular, a somatic mutation was identified in exon 7 of the *fumarate hydratase* (*FH*) gene (c.1043G > C, p.Gly348Ala). This patient also carried a germline mutation in exon 3 of *FH* (c.349G > C, p.Ala117Pro). Both mutations were verified by Sanger sequencing (Figure 5A). The p.Ala117Pro mutation has been described previously in patients with multiple leiomyomatosis and/or renal cancer, displaying reduced *FH* activity. Interestingly, the patient’s clinical record revealed that she had benefited from a total hysterectomy at 35 years old for

between *Sdhb*^{-/-} and WT imCCs along the y axis and the CpG island methylation difference between *SDHx*-related PGL/PCC and other tumors along the x axis. Genes significantly hypermethylated in both human tumors and mouse chromaffin cells are indicated in red.

(G) Cell migration is shown in a wound scratch assay after 10 hr, in standard medium or following 72 hr of DAC treatment at 10 nM or 5 μM. Scale bar = 100 μm.

(H) Reversion of the migratory phenotype by decitabine treatment. Data are mean ± SEM.

See also Figure S2 and Table S3.

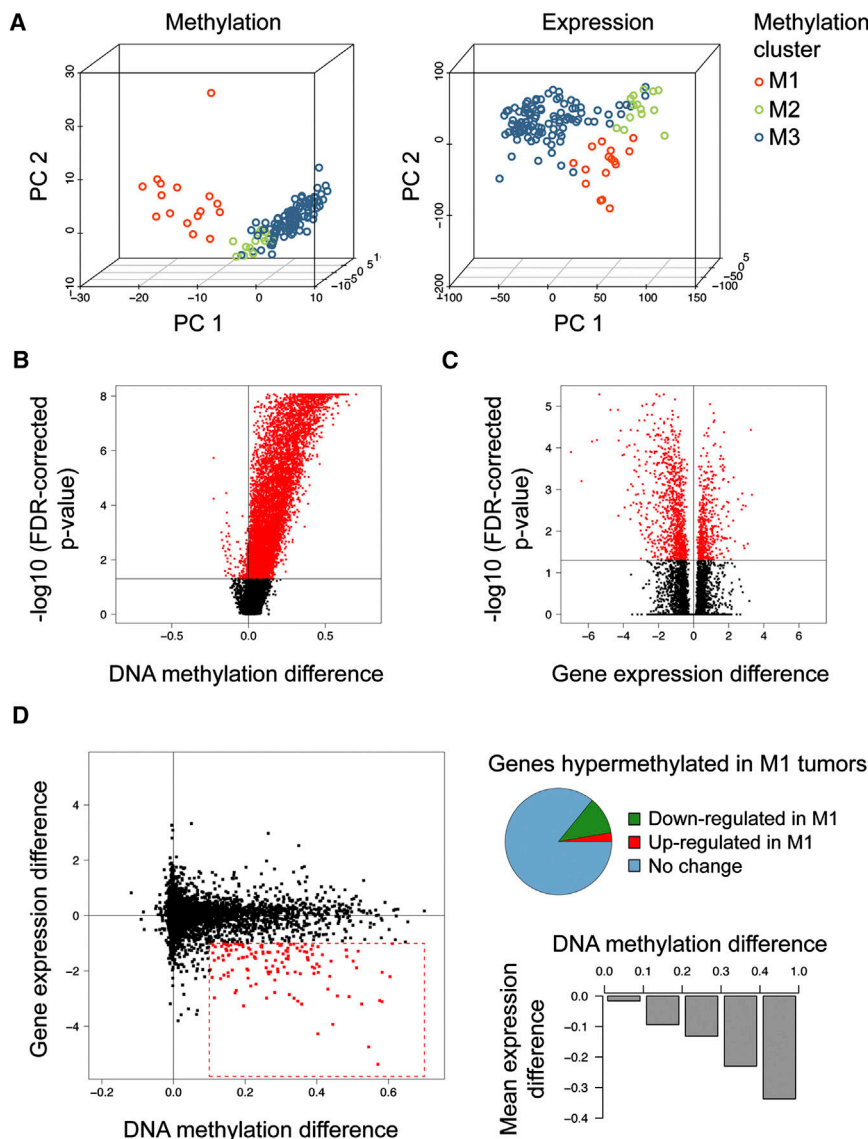


Figure 4. Transcriptional Changes Associated with the Hypermethylator Phenotype in SDH-Related PGL/PCC

(A) Principal component analysis of methylation (left) and expression (right) profiles of PGL/PCC. Tumor samples are plotted in three dimensions using their projections onto the first three principal components (PC). Methylation cluster membership is represented by a color code as described in the legend.

(B) Volcano plot analysis of differentially methylated CpG sites in tumors displaying a hyper-methylator phenotype (cluster M1). The beta value difference in DNA methylation between M1 and non-M1 tumors is plotted on the x axis, and the false-discovery rate (FDR)-adjusted significance is plotted on the y axis ($-\log_{10}$ scale). Red indicates probes differing significantly between groups.

(C) Volcano plot analysis of genes differentially expressed between M1 and non-M1 tumors.

(D) Integrated analysis of promoter DNA methylation and gene expression differences between M1 and non-M1 tumors. The starburst plot (left) represents the DNA methylation (x axis) and gene expression (y axis) differences between M1 and non-M1 tumors. Genes that are hypermethylated with a beta value difference > 0.1 and have a more than 2-fold decrease in expression levels in M1 tumors are shown as red data points. The pie chart (top right) shows the proportion of hypermethylated genes (FDR adjusted $p < 0.05$ and beta value difference > 0.1) that are significantly up- and downregulated in M1 tumors (gene expression difference > 1 and < -1 , respectively). The histogram (bottom right) shows the mean difference in gene expression levels between M1 and non-M1 tumors as a function of the amplitude of DNA methylation beta value differences. See also Figure S4 and Tables S6, S7, S8, and S9.

hemorrhagic fibromas. The p.Gly348Ala mutation has not been described previously and was predicted to be “probably damaging” by Polyphen software. Tumor HS_121 displayed a selective loss of FH activity (Figure 5B), accompanied by an increase in fumarate concentrations (Figure 5C). Fumarate, like succinate, is a competitive inhibitor of 2-OG-dependent dioxygenases (Xiao et al., 2012), so these findings strongly suggest that FH inactivation causes PGL/PCC by establishing a hyper-methylator phenotype.

DNA Hypermethylation and Associated Gene Silencing Are Stronger in *SDHB*-Mutated Tumors

SDHB-mutated PGL/PCC tend to be more malignant than tumors harboring mutations in other SDH subunits (Amar et al., 2005; Pasini and Stratakis, 2009). To determine whether this aggressive behavior is associated with a more severe hyper-methylator phenotype, we calculated the mean methylation level across all the CpG sites significantly hypermethylated in

in M2 and M3 tumors (Figure 6A); but, *SDHB*-mutated tumors displayed stronger hypermethylation than other M1 tumors (1 *SDHA*-, 1 *SDHC*-, 3 *SDHD*-, and 1 *FH*-mutated tumors) ($p = 0.0071$). We examined the transcriptional consequences of these differences by calculating the mean expression level of the 191 genes significantly hypermethylated and downregulated in M1 tumors (Table S8). Although these genes were downregulated in all M1 tumors as compared to M2 and M3 tumors, their expression was significantly lower in *SDHB*-mutated tumors than in other M1 tumors ($p = 0.0055$, Figure 6B). The levels of hypermethylation and downregulation of target genes were highly correlated (Pearson's $r = -0.93$, $p = 7.0 \times 10^{-59}$; Figure 6C), suggesting that DNA methylation finely regulates the expression of these genes in PGL/PCC. These findings support the idea that a stronger hyper-methylator phenotype, associated with a stronger downregulation of target genes, may participate to the metastatic phenotype of *SDHB*-mutated tumors.

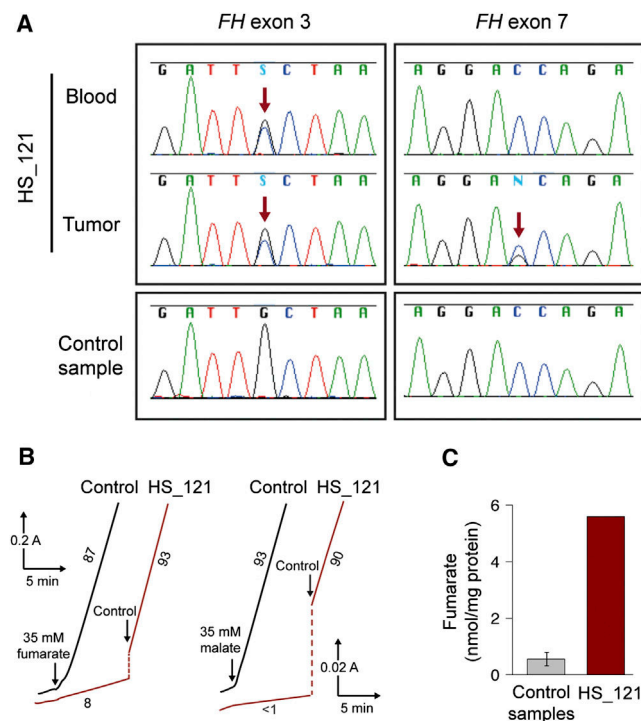


Figure 5. Inactivating *FH* Mutations in the Only Hypermethylated Tumor without *SDHx* Mutation

(A) Sanger sequencing of *FH* gene in DNA extracted from peripheral blood and frozen tumor from patient HS_121 identifies a heterozygous germline mutation (c.349G > C, p.Ala117Pro) in exon 3 and a heterozygous somatic mutation (c.1043G > C, p.Gly348Ala) in exon 7.

(B) Enzymatic activity, assayed spectrophotometrically for the forward (fumarate to malate, left traces) and backward (malate to fumarate, right traces) directions, reveals a severe fumarase deficiency in HS_121 (red) relative to control (black) PGL/PCC samples.

(C) Loss of fumarase activity is associated with a higher fumarate concentration in tumor HS_121 than that in control PGL/PCC ($n = 6$). For controls, data are mean \pm SEM. See also Table S10.

Comparison with the CpG Island Methylator Phenotypes Identified in Colorectal Cancer and Glioblastoma

We investigated whether the hypermethylator phenotype identified in PGL/PCC showed similarities with previously described CIMP phenotypes. We analyzed publicly available data concerning colorectal cancers (Hinoue et al., 2012) and glioblastomas (Noushmehr et al., 2010), obtained with the same Illumina Infinium HM27 methylation array used in this study. For each CpG site, we calculated the mean beta value difference between tumors with and without a hypermethylator phenotype (CIMP-high in colorectal cancer, G-CIMP in glioblastoma). Although we found a significant overlap between hypermethylated loci in the three cancers, the patterns of hypermethylation were particularly similar between PGL/PCC and G-CIMP glioblastomas (Figure 7A). Of 2,241 CpG sites hypermethylated in PGL/PCC of the M1 subgroup (mean beta value difference >0.2 as compared to non-M1 tumors), 847 (38%) were also hypermethylated in G-CIMP glioblastomas, whereas only 279 (12%) were hypermethylated in CIMP-high-colorectal tumors (Figure 7B). Gene set enrichment analysis (GSEA) confirmed that the set of genes hypermethylated in PGL/PCC was more significantly

enriched in genes hypermethylated in G-CIMP glioblastomas (enrichment score = 0.75) than genes hypermethylated in CIMP-high-colorectal cancers (enrichment score = 0.47) (Figure S5). Seventeen of the 191 genes epigenetically silenced in PGL/PCC were significantly hypermethylated and downregulated in glioblastoma (including *PNMT* and *RBP1*); 21 were hypermethylated but without significant downregulation (like *KRT19*); and 119, like *NPY*, were not found to be hypermethylated in glioblastoma (Table S8). The similarity between PGL/PCC and glioblastoma hypermethylator phenotypes may reflect the preferential activities of the 2-OG-dependent demethylases inhibited in these two cancers.

DISCUSSION

Metabolic reprogramming in cancer has long been regarded as an indirect response to cell proliferation, but recent evidence has shown that metabolites themselves can be oncogenic by altering several cellular processes (Ward and Thompson, 2012). The oncometabolite 2-HG, produced by mutated IDH enzymes, establishes the G-CIMP phenotype in glioma by inhibiting DNA and histone demethylases (Xu et al., 2011). Succinate and fumarate can activate the oncogenic HIF pathway by inhibiting HIF prolyl-hydroxylases (Brière et al., 2005; Selak et al., 2005). Here, we demonstrate that succinate accumulation in SDH-deficient PGL/PCC establishes a hypermethylator phenotype, by inhibiting 2-OG-dependent oxidative demethylation. Besides, we describe a specific model of SDH-related PGL/PCC, generated by knocking out *Sdhb* gene in chromaffin cells. In the past, the lack of an appropriate cellular model has opposed severe limitations to the understanding of SDH-related oncogenesis. Our model displays a complete inactivation of SDH activity, which cannot be achieved by siRNA-mediated gene silencing, and will be a crucial tool for deciphering the consequences of SDH inactivation in these cells. Our study also led to the identification of a case of *FH* germline mutation in an apparently sporadic PCC displaying a hypermethylator phenotype. *FH* mutations are known to predispose to hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (Tomlinson et al., 2002) but have never been described in PGL/PCC. Altogether, these findings shed light on a novel pathway explaining the tumor-suppressive role of SDH and FH and, echoing the role of *IDH* mutation in glioma, emphasize the link between TCA cycle dysfunction and epigenomic alterations in cancer. Gastrointestinal stromal tumors, renal cancer, and leiomyomas harboring *SDH* or *FH* mutations may also display epigenetic reprogramming, which should be assessed in future DNA methylation studies.

Many cancer-specific hypermethylation events occur in promoter regions of genes that are not normally expressed and are therefore not affected by DNA methylation changes (Widschwendter et al., 2007). To distinguish DNA methylation events of potential functional significance (“driver events”) from these “passenger events”, we integrated the DNA methylation data with gene expression profiles of the same tumors. Only 11.5% of genes with significant promoter hypermethylation in PGL/PCC of the M1 subgroup were underexpressed in these tumors. This is consistent with previous reports in colorectal cancer (7.3%; Hinoue et al., 2012) and glioblastoma (17%; Noushmehr

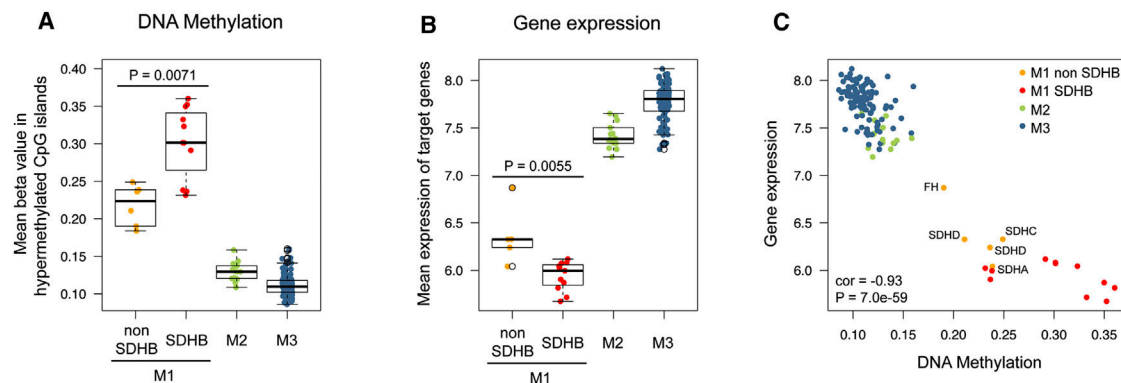


Figure 6. The Hypermethylator Phenotype Is Particularly Severe in SDHB-Mutated Tumors

(A) Mean methylation of all CpG island probes significantly hypermethylated in M1 tumors, according to tumor subgroup. Box-and-whisker plots show the distribution of mean beta values relative to each DNA methylation subgroup. M1 tumors are separated into SDHB-mutated and SDHB-wild-type tumors. The middle bar, median; box, interquartile range; bars extend to 1.5 times the interquartile range.

(B) Mean expression of genes significantly hypermethylated and downregulated in M1 tumors, according to tumor subgroup.

(C) Distribution of mean expression levels of target genes relative to the mean methylation levels of CpG sites hypermethylated in M1 tumors. Tumor subgroups are represented with a color code, and the mutations of non-SDHB-mutated M1 tumors are indicated next to each dot.

et al., 2010). Thus, most hypermethylated CpG sites appear to be silent consequences of the inhibition of DNA demethylases, with no evident functional impact. We were however able to show an overall correlation between the level of hypermethylation and downregulation of gene expression. In particular, we identified 191 genes that showed significant hypermethylation and downregulation in M1 tumors and whose expression was closely correlated with the degree of DNA methylation.

Two of the genes showing the strongest evidence for epigenetic silencing in hypermethylated PGL/PCC are, respectively, involved in the differentiation of chromaffin cells (*PNMT*; Eisenhofer et al., 2011) and the epithelial-to-mesenchymal transition (*KRT19*; Moreno-Bueno et al., 2006), which was recently identified as the first mechanistic clue to explain the particularly invasive phenotype of SDHB-related tumors (Loriot et al., 2012). The *PNMT* gene encodes the phenyl-ethanolamine-N-methyltransferase, a key enzyme of chromaffin cell metabolism, which catalyzes the conversion of noradrenaline to adrenaline. Reduced *PNMT* expression has been reported in SDH-related tumors, leading to an immature catecholamine secretory profile with predominant secretion of noradrenaline or dopamine (Burnichon et al., 2012b; Eisenhofer et al., 2001). Our findings reveal that *PNMT* is hypermethylated in SDH-related tumors, together with four other genes implicated in catecholamine metabolism (*DRD2*, *SULT1A1*, *SLC6A2*, and *NPY*). Epigenetic regulation is thus a previously unsuspected mechanism explaining the dedifferentiated phenotype of this subgroup of PGL/PCC. Another target of the PGL/PCC hypermethylator phenotype, *RBP1*, is also epigenetically silenced in G-CIMP gliomas (Noushmehr et al., 2010) and several cancer cell lines and primary tumors (Esteller et al., 2002). *RBP1* is involved in retinoic acid signaling, leading to loss of cell differentiation and tumor progression (Farias et al., 2005) and may thus have a tumor-suppressive role in PGL/PCC. Studies aimed at elucidating the functional consequences of epigenetic gene silencing will undoubtedly improve our understanding of the role of DNA hypermethylation in PGL/PCC tumorigenesis.

SDH- and VHL-related tumors were previously shown to have similar gene expression features, like the activation of hypoxia-related genes (Dahia et al., 2005). In the COMETE cohort, we showed that, although close, these tumors were classified in two separate gene expression clusters (C1A and C1B) (Burnichon et al., 2011). Here, we found that 150 out of 344 genes (44%) significantly downregulated in SDH- as compared to VHL-tumors were hypermethylated (data not shown). Epigenetic remodeling thus explains a significant part of transcriptional differences between SDH- and VHL-related tumors.

SDHB mutations confer a much worse prognosis than mutations in other SDHx genes (Amar et al., 2007). No mechanism has been proposed to explain these differences. We found that although all SDHx-mutated tumors displayed a hypermethylator phenotype, the level of hypermethylation was significantly higher, and the expression of target genes was significantly lower in SDHB-mutated tumors. As target genes include genes implicated in neuroendocrine differentiation and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), this may explain the particular malignancy of SDHB-mutated tumors. SDHB encodes a catalytic subunit of SDH (Rutter et al., 2010). We hypothesize that SDH inactivation may be more complete in SDHB-mutated tumors than in tumors harboring mutations in other subunits, leading to a higher succinate accumulation and hence to a stronger inhibition of 2-OG-dependent demethylation. However, we were not able to detect significant differences in succinate concentrations between SDHB-mutated and other SDH-related tumors. Future studies will be needed to dissect the functional impact of mutations affecting different SDH subunits.

There have recently been several promising findings for epigenetic cancer therapy. Notably, Tsai et al. (2012) demonstrated that low doses of the DNA demethylating agents, DAC and azacitidine, had durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. Thus, low doses may help avoid the extreme toxicities of these agents at high dose that have prevented the investigation of the true clinical responses. We show

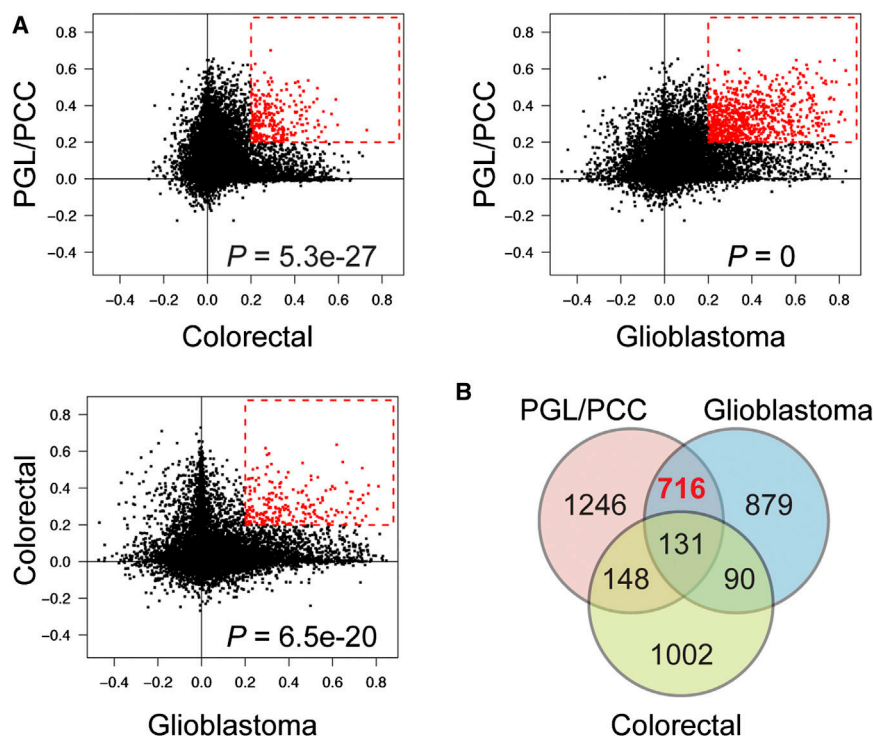


Figure 7. Comparison of Hypermethylator Phenotypes in PGL/PCC, Colorectal Cancer, and Glioblastoma

(A) Correlation between CIMP-specific hypermethylation patterns in the three cancers. The mean beta value difference between CIMP and non-CIMP tumors was calculated for all CpG sites in each cancer type. Each scatterplot represents the correlation of beta value differences between two cancers. Red dots indicate CpG sites hypermethylated in the CIMP subgroups of both cancers (beta value difference >0.2 between CIMP and non-CIMP tumors).

(B) Venn diagram showing hypermethylated loci shared by the PGL/PCC hypermethylator phenotype, the colorectal cancer CIMP-high phenotype, and the glioblastoma G-CIMP phenotype. See also Figure S5.

that the increased migratory capacities of *Sdhb*^{-/-} mouse chromaffin cells are repressed by transient DAC treatment, even at a 10 nM concentration, which led to minor cytotoxicity. The precise molecular changes associated with these treatments will have to be deciphered in future studies, both in vitro and in vivo. In view of these findings, the reversal of promoter DNA hypermethylation and associated gene silencing may rise as an attractive alternative approach to surgery for *SDHx*- and *FH*-mutated PGL/PCC. NPY, which shows the strongest transcriptional silencing in M1 tumors, may be a good marker. NPY levels were shown to be increased in the plasma and tumors of patients with PCC and to be significantly lower in extra-adrenal tumors (deS Senanayake et al., 1995). A comprehensive study of candidate markers in a large independent cohort will be useful to determine the best marker of this aggressive subgroup.

In summary, our analysis indicates that PGL/PCC can be classified into three distinct subgroups according to genome-scale DNA methylation changes. The identification of a hypermethylator phenotype in *SDHx*- and *FH*-mutated tumors helps in explaining both the tumor-suppressive role of these genes and some of the phenotypic characteristics of these tumors. The malignancy of *SDHB*-mutated PGL/PCC may be due to a severe epigenetic silencing of genes involved in cell differentiation and EMT. These findings have clinical implications for PGL/PCC diagnosis and may lead to targeted epigenetic treatment for patients with TCA cycle alterations.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Collection and Processing of PGL/PCC and Normal Tissue Samples

A total of 145 tumor samples from 145 different patients recruited in the COMETE network from 1993 to 2008 were included in the study. Ethical approval for the study was obtained from the institutional review board

QIAamp DNA Mini Kit or an AllPrep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). For details, see the Supplemental Experimental Procedures.

DNA Methylation Arrays

Whole-genome DNA methylation was analyzed in 145 PGL or PCC and three normal adrenal medulla samples using the Illumina Infinium HumanMethylation27 assay (Bibikova et al., 2009). Twenty-four samples were later reanalyzed using the more comprehensive Illumina Infinium HumanMethylation450 Beadchips. Microarray experiments were performed by Integrigen SA (Evry, France). In brief, genomic DNA was bisulfite-converted using the EZ-96 DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), whole-genome amplified, enzymatically fragmented, and hybridized to the BeadChip arrays in accordance with the manufacturer's instructions. The beta value DNA methylation scores for each locus were extracted together with detection p values from Illumina GenomeStudio software. As described elsewhere (Hinoue et al., 2012), we replaced data points with a detection p value >0.05 by "NA" values, and we masked data points as "NA" for 4,484 probes that contain single-nucleotide polymorphisms or overlap with a repetitive element that are not uniquely aligned to the human genome (NCBI build 36/Hg18) or that overlap with regions of insertions and deletions in the human genome. Probes were considered to be in a promoter CpG island if they were located within a CpG island (UCSC database) and less than 1,500 bp away from a transcription start site.

DNA Methylation-Based Classification of Pheochromocytomas and Paragangliomas

We used consensus clustering (Monti et al., 2003) to identify PGL/PCC subgroups on the basis of their DNA methylation profiles. We selected the 10% most variant probes ($n = 2,152$) among those that did not contain any «NA»-masked data point. We then established consensus partitions of the data set in K clusters (for $K = 2, 3, \dots, 8$), based on 1,000 resampling iterations of hierarchical clustering, with Pearson's dissimilarity as the distance metric and Ward's method for linkage analysis. We used the cumulative distribution functions (CDF) of the consensus matrices to determine the optimal number of clusters, considering both the shape of the functions and the area under the CDF curves (Figure S1). The Bioconductor ConsensusClusterPlus package was used for consensus clustering analysis.

Reduced Representation Bisulphite Sequencing Analysis of Mouse Chromaffin Cells

RRBS was performed by Integragen SA (Evry, France), as described elsewhere (Gu et al., 2011; Smallwood and Kelsey, 2012). In brief, 300 ng of mouse genomic DNA were digested with 14 units of MspI (NEB). After end-repair, A-tailing, and ligation to methylated Illumina adapters, the library fragments of 40–220 bp were gel isolated, subjected to a double bisulfite conversion with the EpiTect Bisulfite kit from QIAGEN, PCR amplified, and sequenced on an Illumina HiSeq2000 sequencer as paired-end 75 bp reads. We used Trim Galore! (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore) to filter out the adaptor sequences. Bisulfite mapping and methylation calling were performed in a single step using the bismark software (Krueger and Andrews, 2011). Only reads uniquely aligned to the mm9 assembly of the mouse genome were retained, and we required a coverage of at least ten reads to call methylation score for a CpG site. We downloaded the list of Mouse CpG islands from the UCSC genome browser, and we inferred a DNA methylation rate to each CpG island with more than ten individual CpG measurements and more than 100 total reads. To identify differentially methylated CpG sites or CpG islands, we compared the number of methylated and unmethylated observations in WT and *Sdhb*^{−/−} cells using Fisher's exact test. CpG islands with an FDR-adjusted p value <0.05 and absolute methylation difference >5% were considered differentially methylated. Human and mouse orthologs were downloaded from the Mouse Genome Database (Eppig et al., 2012).

Generation of *Sdhb*^{−/−} Immortalized Mouse Chromaffin Cells

Sdhb-floxed mice were generated at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France). A targeting vector containing *Sdhb* exon 2 flanked by LoxP sites followed by a neomycin (neo) selection cassette flanked by Frt sites (Figure 2A) was introduced into P1 (129 S2/SvPas) ES cells by electroporation. Two positive embryonic stem clones were injected into C57BL/6J blastocysts, and the resulting male chimeras gave germline transmission. These mice were mated to Flipase-expressing mice to delete the *Neo* cassette. *Sdhb*^{+/lox} mice were intercrossed to obtain *Sdhb*^{lox/lox} mice, and mouse chromaffin cells (mCCs) were isolated from the adrenal medulla of these *Sdhb*^{lox/lox} as described elsewhere (Kolski-Andreaco et al., 2007). All studies were performed in accordance with the relevant guidelines of the French Ministry of Agriculture (Authorization Executive Order A751532) for scientific experimentation on animals, European Communities Council Directive, and international ethical standards. Cells were cultured at 37°C, under 5% CO₂ in a standard medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium with glutamine and a high glucose concentration (DMEM glutaMAX, GIBCO, Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO). The cultures remained quiescent for 6 months, after which some started to grow spontaneously from mCCs clusters. These immortalized cells were isolated and infected with 10⁷ plaque-forming units (pfu)/ml of an adenovirus expressing Cre-recombinase (Ad5CMV-Cre, Cell BioLabs, San Diego). A clonal approach by limiting dilution cloning assay was used to obtain homogeneous *Sdhb*^{−/−} immortalized mCCs clones (imCC clones 6 and 8). *Sdhb*^{−/−} and *Sdhb*^{lox/lox} (referred to as WT) imCCs were maintained in standard medium with or without 2.5 mM dimethyl 2-oxoglutarate (Sigma-Aldrich, St. Louis).

ACCESSION NUMBERS

Methylation array data from the 148 human samples and RRBS data from the four mouse cell lines analyzed in this study have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) and are accessible through the GEO series accession number GSE43298.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes ten tables, five figures, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the "Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT) program" funded and developed by the "Ligue Nationale contre le Cancer" (<http://cit.ligue-cancer.net>).

We express our gratitude to Profs. Pierre-François Plouin and Xavier Bertagna for making this work possible by creating the COMETE Network 20 years ago. We are grateful to Prof. X. Jeunemaitre for helpful discussions and continual support. We thank Dr. Juliette Hadchouel for her technical advice and the Mouse Clinical Institute for generating the *Sdhb*^{+/lox} mouse. We thank Jacqueline Godet and Jacqueline Metral for their strong support within the CIT program. We also thank Nabila Elarouci, Dr. Rossella Libé, Prof. Cécile Badoual, and Dr. Frédérique Tissier for their help, all members of the HEGP Genetics department, and Catherine Tritscher for technical assistance. We also thank Mélanie Letexier and Maud Vandpeene from IntegraGen for their efficacy in generating methylation data. The text was edited by Alex Edelman and associates. The work leading to these results has received funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 08 GENOPATH 029 MitOxy and ANR-2011-JCJC-00701 MODEOMAPP), the GtS-Institut des Maladies Rares, and the Programme Hospitalier de Recherche Clinique grant COMETE 3 (AOM 06 179). The work leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement number 259735.

Received: October 13, 2012

Revised: January 29, 2013

Accepted: April 20, 2013

Published: May 23, 2013

REFERENCES

- Amar, L., Bertherat, J., Baudin, E., Aizenberg, C., Bressac-de Paillerets, B., Chabre, O., Chamontin, B., Delemer, B., Giraud, S., Murat, A., et al. (2005). Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J. Clin. Oncol.* 23, 8812–8818.
- Amar, L., Baudin, E., Burnichon, N., Peyrard, S., Silvera, S., Bertherat, J., Bertagna, X., Schlumberger, M., Jeunemaitre, X., Gimenez-Roqueplo, A.P., and Plouin, P.F. (2007). Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3822–3828.
- Baysal, B.E., Ferrell, R.E., Willett-Brozick, J.E., Lawrence, E.C., Myssiorek, D., Bosch, A., van der Mey, A., Taschner, P.E., Rubinstein, W.S., Myers, E.N., et al. (2000). Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287, 848–851.
- Bibikova, M., Le, J., Barnes, B., Saedinia-Melnyk, S., Zhou, L., Shen, R., and Gunderson, K.L. (2009). Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. *Epigenomics* 1, 177–200.
- Brière, J.J., Favier, J., Bénit, P., El Ghouzzi, V., Lorenzato, A., Rabier, D., Di Renzo, M.F., Gimenez-Roqueplo, A.P., and Rustin, P. (2005). Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1α nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3263–3269.
- Burnichon, N., Vescovo, L., Amar, L., Libé, R., de Reynies, A., Venisse, A., Jouanno, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Bertherat, J., et al. (2011). Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3974–3985.
- Burnichon, N., Buffet, A., Parfait, B., Letouzé, E., Laurendeau, I., Lorient, C., Pasmant, E., Abermil, N., Valeyrie-Allanore, L., Bertherat, J., et al. (2012a). Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma. *Hum. Mol. Genet.* 27, 5397–5405.
- Burnichon, N., Cascón, A., Schiavi, F., Morales, N.P., Comino-Méndez, I., Abermil, N., Inglada-Pérez, L., de Cubas, A.A., Amar, L., Barontini, M., et al. (2012b). MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin. Cancer Res.* 18, 2828–2837.
- Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* 10, 295–304.

- Dahia, P.L., Ross, K.N., Wright, M.E., Hayashida, C.Y., Santagata, S., Barontini, M., Kung, A.L., Sanso, G., Powers, J.F., Tischler, A.S., et al. (2005). A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet.* 1, 72–80.
- deS Senanayake, P., Denker, J., Bravo, E.L., and Graham, R.M. (1995). Production, characterization, and expression of neuropeptide Y by human pheochromocytoma. *J. Clin. Invest.* 96, 2503–2509.
- Eisenhofer, G., Walthers, M.M., Huynh, T.T., Li, S.T., Bornstein, S.R., Vortmeyer, A., Mannelli, M., Goldstein, D.S., Linehan, W.M., Lenders, J.W., and Pacak, K. (2001). Pheochromocytomas in von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1999–2008.
- Eisenhofer, G., Pacak, K., Huynh, T.T., Qin, N., Bratslavsky, G., Linehan, W.M., Mannelli, M., Friberg, P., Grebe, S.K., Timmers, H.J., et al. (2011). Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma. *Endocr. Relat. Cancer* 18, 97–111.
- Eppig, J.T., Blake, J.A., Bult, C.J., Kadin, J.A., and Richardson, J.E.; Mouse Genome Database Group. (2012). The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue), D881–D886.
- Esteller, M., Guo, M., Moreno, V., Peinado, M.A., Capella, G., Galm, O., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2002). Hypermethylation-associated inactivation of the cellular retinol-binding-protein 1 gene in human cancer. *Cancer Res.* 62, 5902–5905.
- Farias, E.F., Ong, D.E., Ghyselinck, N.B., Nakajo, S., Kuppumbatti, Y.S., and Mira y Lopez, R. (2005). Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 21–29.
- Favier, J., Brière, J.J., Burnichon, N., Rivière, J., Vescovo, L., Benit, P., Giscos-Douriez, I., De Reyniès, A., Bertherat, J., Badoual, C., et al. (2009). The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PLoS ONE* 4, e7094.
- Favier, J., Buffet, A., and Gimenez-Roqueplo, A.P. (2012). HIF2A mutations in paraganglioma with polycythemia. *N. Engl. J. Med.* 367, 2161, author reply 2161–2162.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 307, 89–92.
- Geli, J., Kiss, N., Karimi, M., Lee, J.J., Bäckdahl, M., Ekström, T.J., and Larsson, C. (2008). Global and regional CpG methylation in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas: association to malignant behavior. *Clin. Cancer Res.* 14, 2551–2559.
- Gimenez-Roqueplo, A.P., Dahia, P.L., and Robledo, M. (2012). An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm. Metab. Res.* 44, 328–333.
- Gimenez-Roqueplo, A.P., Favier, J., Rustin, P., Mourad, J.J., Plouin, P.F., Corvol, P., Rötig, A., and Jeunemaitre, X. (2001). The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1186–1197.
- Gimenez-Roqueplo, A.P., Favier, J., Rustin, P., Rieubland, C., Crespin, M., Nau, V., Khau Van Kien, P., Corvol, P., Plouin, P.F., and Jeunemaitre, X.; COMETE Network. (2003). Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res.* 63, 5615–5621.
- Gu, H., Smith, Z.D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., and Meissner, A. (2011). Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* 6, 468–481.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hinoue, T., Weisenberger, D.J., Lange, C.P., Shen, H., Byun, H.M., Van Den Berg, D., Malik, S., Pan, F., Noushmehr, H., van Dijk, C.M., et al. (2012). Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* 22, 271–282.
- Houseman, E.A., Christensen, B.C., Yeh, R.F., Marsit, C.J., Karagas, M.R., Wrensch, M., Nelson, H.H., Wiemels, J., Zheng, S., Wiencke, J.K., and Kelsey, K.T. (2008). Model-based clustering of DNA methylation array data: a recursive-partitioning algorithm for high-dimensional data arising as a mixture of beta distributions. *BMC Bioinformatics* 9, 365.
- Janeway, K.A., Kim, S.Y., Lodish, M., Nosé, J., Rustin, P., Gaal, J., Dahia, P.L., Liegl, B., Ball, E.R., Raygada, M., et al.; NIH Pediatric and Wild-Type GIST Clinic. (2011). Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 314–318.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683–692.
- Kolski-Andreaco, A., Cai, H., Currie, D.S., Chandy, K.G., and Chow, R.H. (2007). Mouse adrenal chromaffin cell isolation. *J. Vis. Exp.* 2007 Jan 5, 129.
- Krueger, F., and Andrews, S.R. (2011). Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 27, 1571–1572.
- Laird, P.W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* 3, 253–266.
- Lenders, J.W., Eisenhofer, G., Mannelli, M., and Pacak, K. (2005). Pheochromocytoma. *Lancet* 366, 665–675.
- Loriot, C., Burnichon, N., Gadessaud, N., Vescovo, L., Amar, L., Libé, R., Bertherat, J., Plouin, P.F., Jeunemaitre, X., Gimenez-Roqueplo, A.P., and Favier, J. (2012). Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E954–E962.
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G.W., Ramsahoye, B., Lander, E.S., and Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 33, 5868–5877.
- Monti, S., Tamayo, P., Mesirov, J.P., and Golub, T.R. (2003). Consensus clustering. A resampling-based method for class discovery and visualization of gene-expression microarray data. *Mach. Learn.* 52, 91–118.
- Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrió, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S.M., Villa, S., Bolós, V., Jordá, M., Fabra, A., Portillo, F., et al. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 66, 9543–9556.
- Neumann, H.P., Bausch, B., McWhinney, S.R., Bender, B.U., Gimm, O., Franke, G., Schipper, J., Klisch, J., Althoefer, C., Zerres, K., et al.; Freiburg-Warsaw-Columbus Pheochromocytoma Study Group. (2002). Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.* 346, 1459–1466.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al.; Cancer Genome Atlas Research Network. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17, 510–522.
- Pasini, B., and Stratakis, C.A. (2009). SDH mutations in tumorigenesis and inherited endocrine tumours: lesson from the pheochromocytoma-paraganglioma syndromes. *J. Intern. Med.* 266, 19–42.
- Pencheva, N., Tran, H., Buss, C., Huh, D., Drobnjak, M., Busam, K., and Tavazoie, S.F. (2012). Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. *Cell* 151, 1068–1082.
- Pollard, P.J., Brière, J.J., Alam, N.A., Barwell, J., Barclay, E., Wortham, N.C., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, S.J., et al. (2005). Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2231–2239.
- Ricketts, C., Woodward, E.R., Killick, P., Morris, M.R., Astuti, D., Latif, F., and Maher, E.R. (2008). Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 1260–1262.
- Rodríguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* 17, 330–339.

- Rutter, J., Winge, D.R., and Schiffman, J.D. (2010). Succinate dehydrogenase - assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10, 393–401.
- Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., and Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7, 77–85.
- Takai, D., and Jones, P.A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3740–3745.
- Tomlinson, I.P., Alam, N.A., Rowan, A.J., Barclay, E., Jaeger, E.E., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., et al.; Multiple Leiomyoma Consortium. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat. Genet.* 30, 406–410.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8681–8686.
- Tsai, H.C., Li, H., Van Neste, L., Cai, Y., Robert, C., Rassool, F.V., Shin, J.J., Harbom, K.M., Beaty, R., Pappou, E., et al. (2012). Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* 21, 430–446.
- van Nederveen, F.H., Gaal, J., Favier, J., Korpershoek, E., Oldenburg, R.A., de Bruyn, E.M., Sleddens, H.F., Derkx, P., Rivière, J., Dannenberg, H., et al. (2009). An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol.* 10, 764–771.
- Smallwood, S.A., and Kelsey, G. (2012). Genome-wide analysis of DNA methylation in low cell numbers by reduced representation bisulfite sequencing. *Methods Mol. Biol.* 925, 187–197.
- Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308.
- Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D.J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I., and Laird, P.W. (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat. Genet.* 39, 157–158.
- Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., et al. (2012). Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.* 26, 1326–1338.
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.T., et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19, 17–30.
- Young, R.M., and Simon, M.C. (2012). Untuning the tumor metabolic machine: HIF- α : pro- and antitumorigenic? *Nat. Med.* 18, 1024–1025.

Supplemental Information

SDH Mutations Establish

a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma

Eric Letouzé, Cosimo Martinelli, Céline Lorient, Nelly Burnichon, Nasséra Abermil, Chris Ottolenghi, Maxime Janin, Mélanie Menara, An Thach Nguyen, Paule Benit, Alexandre Buffet, Charles Marcaillou, Jérôme Bertherat, Laurence Amar, Pierre Rustin, Aurélien De Reyniès, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo, and Judith Favier

Inventory of Supplemental Information

Supplemental Data

Table S1, provided as an Excel file, related to Figure 1

Table S2, related to Figure 1

Figure S1, related to Figure 1

Figure S2, related to Figure 2

Table S3, provided as an Excel file, related to Figure 2

Figure S3, related to Figure 3

Table S4, related to Figure 3

Table S5, related to Figure 3

Figure S4, related to Figure 4

Table S6, provided as an Excel file, related to Figure 4

Table S7, provided as an Excel file, related to Figure 4

Table S8, provided as an Excel file, related to Figure 4

Table S9, provided as an Excel file, related to Figure 4

Table S10, related to Figure 5

Figure S5, related to Figure 7

Supplemental Experimental Procedures

Supplemental References

Supplemental Data

Table S2, related to Figure 1. Number of probes significantly hyper- and hypomethylated ($P < 0.01$) in each tumor subgroup as compared to normal samples

		M1	M2	M3
Probes within CpG islands (n = 16,620)	hyper	904 (7.2%)	130 (1.0%)	229 (1.8%)
	hypo	117 (0.9%)	120 (1.0%)	194 (1.5%)
Probes outside CpG islands (n = 8,895)	hyper	625 (7.0%)	260 (2.9%)	91 (1.0%)
	hypo	231 (2.6%)	525 (5.9%)	857 (9.6%)

Panels A to E represent consensus clustering results. Panel F illustrates RPMM results and the comparison of the two methods.

(A) Cumulative distribution functions (CDF) of the consensus matrix for each number k of clusters ($k=2, 3, \dots, 8$). The shape and area under CDF curves allow one to select the appropriate number of clusters. Here, CDF curves for $k=2$ and $k=3$ display clear bimodal shapes, indicating the presence of true clusters.

(B) Delta area plot showing the relative change in area under the CDF curves.

(C) Consensus matrices for $k=2$ to 5 clusters. Consensus values range from 0 (never clustered together, white) to 1 (always clustered together, dark blue). Samples are ordered on the x and y axes by the consensus clustering, which is depicted as a dendrogram atop the heatmap.

(D) Tracking plot showing the cluster assignment of tumors (columns) for each number k of clusters (rows). Clusters M1 (dark blue) and M2 (light green) are stable for each $k \geq 3$. Cluster M3 (light blue, line 3) is separated in diverse subclusters when $k \geq 4$.

(E) Tumor consensus plot showing the mean consensus values of each tumor with tumors in the different clusters. Each sample is represented by a stacked bar. The coloured portions of the bars indicate the consensus values of the tumors with other tumors belonging to each cluster. The asterisks at the bottom indicate the consensus cluster for each tumor, and the consensus value for each cluster is indicated below.

(F) Left: Heatmap representation of DNA methylation profiles classified using the recursively partitioned mixture model (RPMM). The RPMM approach identified 4 subgroups in our series. RPMM and consensus cluster assignments are indicated above the heatmap. Right: Contingency table comparing the cluster membership assignments between the two clustering approaches.

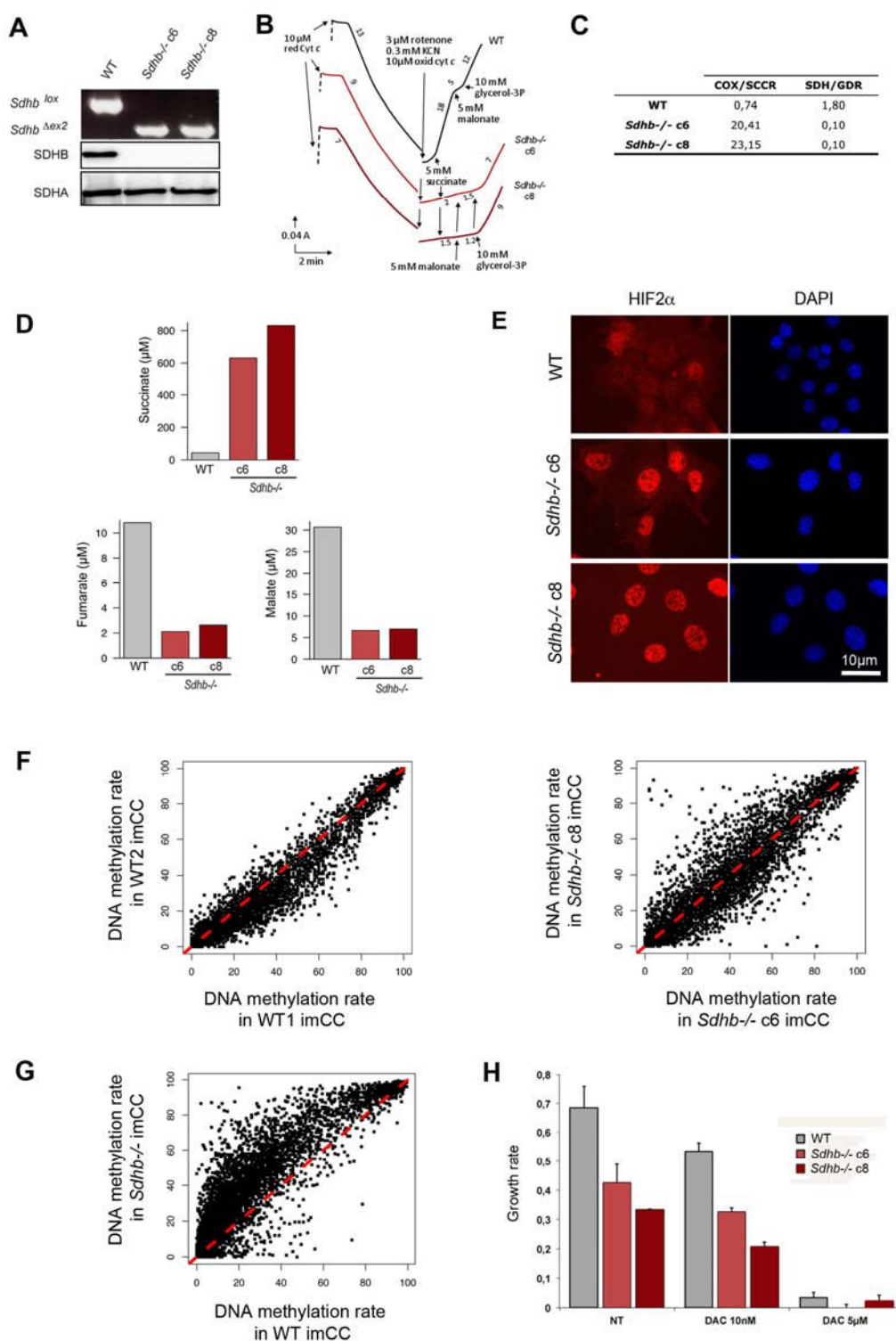


Figure S2, related to Figure 2. Generation and characterization of an *Sdhb*-deficient cellular model

(A) Two *Sdhb*^{-/-} pure clones (c6 and c8) were isolated and genotyped by PCR. Efficacy of *Sdhb* knock-out was confirmed by western blot, which revealed a

complete loss of SDHB protein production while SDHA protein was expressed as in *Sdhb*^{lox/lox} (WT) cells.

(B) CIV activity (in black) was spectrophotometrically measured by following the oxidation of added reduced cytochrome c. After adding rotenone (inhibitor of CI), cyanide (inhibitor of CIV) and oxidized cytochrome c, the addition of succinate triggered the activity of the succinate cytochrome c reductase (SCCR) which is essentially inhibited by the addition of malonate. The subsequent addition of glycerol-3P allows measuring the activity of the glycerol-3P cytochrome c reductase. Similar assays were carried out on *Sdhb*^{-/-} c6 (light red) and c8 (dark red) imCCs. Numbers along the traces are nmol/min per mg protein. Cyt, cytochrome; DCPIP, dichlorophenol indophenol; Glycerol-3P, glycerol-3 phosphate; KCN, potassium cyanide.

(C) Respiratory chain activity ratios reveal the loss of SDH and SCCR activities in *Sdhb*^{-/-} cells.

(D) TCA cycle organic acids were measured by GS-MS on conditioned media of WT and *Sdhb*^{-/-} clones c6 and c8, revealing a massive increase in succinate in SDH-deficient cells, associated with a decrease in fumarate and malate release.

(E) Immunofluorescence analysis reveals an increased nuclear translocation of HIF2 α in *Sdhb*^{-/-} clones c6 and c8 versus WT imCC. Scale bar=10 μ m

(F) Scatter plots comparing CpG island methylation levels between the two *Sdhb* wild-type (left) and *Sdhb*^{-/-} (right) mouse chromaffin cells.

(G) Scatter plot comparing CpG island methylation levels between *Sdhb* wild-type (x-axis) and *Sdhb*^{-/-} mouse chromaffin cells.

(H) Proliferation was assessed in WT (grey) and *Sdhb*^{-/-} clones c6 (light red) and c8 (dark red) in non-treated (NT) conditions or after 72h of decitabine (DAC) treatment at 10nM and 5 μ M. Data are mean \pm SEM.

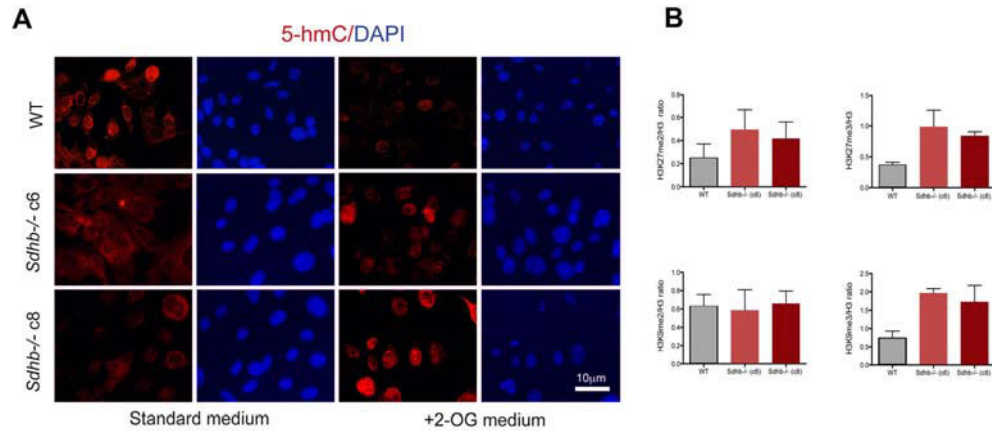


Figure S3, related to Figure 3. Functional consequences of SDH inactivation on oxidative demethylation.

(A) Immunofluorescence studies using an anti-5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) antibody showed low staining in the nuclei of *Sdhb*^{-/-} cells in standard culture conditions. The addition of 2-oxoglutarate (2-OG) to the culture medium led to a marked increase in 5-hmC nuclear staining, specifically in c6 and c8 *Sdhb*^{-/-} imCC but not in wild-type (WT) cells. Scale bar=10 μ m

(B) The levels of H3K27me2, H3K27me3, H3K9me2 and H3K9me3 were quantified using the Image Gauge V3 program (Fuji) on 3 independent western blot experiments, and reported to total histone 3 (H3) levels. H3K27me2, H3K27me3 and H3K9me3 were increased in *Sdhb*^{-/-} clones compared to WT imCC. Data are mean \pm SEM.

Table S4, related to Figure 3. Succinate and fumarate concentrations in tumor samples

Tumor ID	Mutation	Methylation cluster	Fumarate nmol/mg	Succinate nmol/mg
CIT_016	<i>NF1</i>	ND	1,05	1,7
CIT_034	<i>TMEM127</i>	M3	0,17	0,6
CIT_038	<i>NF1s</i>	ND	0,52	1,3
CIT_056	<i>NF1</i>	M3	0,33	0,7
CIT_059	<i>MAX</i>	M3	0,03	0,1
CIT_091		M3	1,22	2,5
CIT_186	<i>SDHA</i>	M1	0,88	127
CIT_082	<i>SDHB</i>	M1	0,24	154
CIT_083	<i>SDHB</i>	M1	0,48	176
CIT_088	<i>SDHD</i>	M1	0,69	133
CIT_048	<i>SDHD</i>	M1	0,84	200
CIT_158	<i>SDHD</i>	ND	0,45	144
CIT_116	<i>SDHB</i>	M1	0,97	393
CIT_121	<i>FH</i>	M1	5,59	3,3
CIT_138	<i>SDHB</i>	M1	1,7	193
CIT_149	<i>SDHB</i>	M1	0,2	49
CIT_196	<i>SDHB</i>	M1	0,44	149
CIT_200	<i>SDHB</i>	M1	1,52	85
CIT_201	<i>SDHB</i>	M1	2,2	48
CIT_207	<i>SDHC</i>	M1	1,17	315

ND: not determined

Table S5, related to Figure 3. Immunohistochemical evaluation of 5-hmC and H3K27me3 levels in human PGL/PCC.

Tumor ID	Gender	Malignancy	Mutation	Methylation cluster	5-hmC score	H3K27me3	H3K9me3
CIT_121	Female	Malignant	<i>FH</i>	M1	Low	High	High
PGL2	Male	Benign	<i>SDHA</i>	ND	Low	High	Low
PGL3	Male	Malignant	<i>SDHB</i>	ND	Low	High	High
CIT_200	Female	Benign	<i>SDHB</i>	M1	Low	High	Low
CIT_201	Female	Malignant	<i>SDHB</i>	M1	Low	Low	Low
CIT_209	Male	Malignant	<i>SDHB</i>	ND	Low	High	High
PGL4	Female		<i>SDHB</i>	ND	Low	High	High
PGL5	Male	Benign	<i>SDHB</i>	ND	Low	High	High
CIT_087	Male	Malignant	<i>SDHB</i>	ND	Low	High	High
CIT_028	Female	Benign	<i>SDHB</i>	M3	Low	High	Low
CIT_106	Male	Benign	<i>SDHB</i>	ND	Low	High	High
CIT_207	Female	Benign	<i>SDHC</i>	M1	Low	High	High
PGL1	Female	Benign	<i>SDHC</i>	ND	Low	High	High
CIT_158	Male	Benign	<i>SDHD</i>	ND	Low	Low	Low
PGL6	Male	Benign	<i>SDHD</i>	ND	Low	High	Low
PGL7	Male	Benign	<i>SDHD</i>	ND	Low	Low	Low
CIT_048	Male	Benign	<i>SDHD</i>	M1	Low	High	High
CIT_022	Male	Benign	<i>VHL</i>	M2	High	Low	Low
CIT_205	Male	Benign	<i>VHL</i>	M2	High	Low	Low
CIT_203	Male	Benign	<i>VHL</i>	ND	Low	High	Low
CIT_018	Female	Malignant	<i>VHLs</i>	ND	High	Low	Low
CIT_124	Male	Benign	<i>VHLs</i>	M2	High	Low	Low
CIT_016	Female	Benign	<i>NF1</i>	ND	Low	Low	Low
CIT_045	Female	Benign	<i>NF1s</i>	M3	High	Low	Low
CIT_003	Male	Benign	<i>NF1s</i>	M3	High	High	High
CIT_072	Female	Benign	<i>NF1s</i>	M3	High	Low	High
CIT_033	Female	Benign	<i>NF1s</i>	M3	Low	High	Low
CIT_041	Female	Benign	<i>RETs</i>	M3	High	Low	Low
CIT_020	Male	Benign		M3	High	High	Low
CIT_057	Male	Benign		M3	Low	High	Low
CIT_030	Male	Benign		ND	High	High	Low
PGL8	Male	Malignant		ND	High	High	Low
PGL9	Female	Benign		ND	High	High	High
PGL10	Male	Malignant		ND	High	Low	Low
PGL11	Female	Malignant		ND	High	High	Low
PGL12	Male	Benign		ND	High	High	Low
PGL13	Female	Benign		ND	High	ND	ND
PGL14	Male	Malignant		ND	Low	High	High
PGL15	Male	Malignant		ND	Low	High	High

ND: not determined

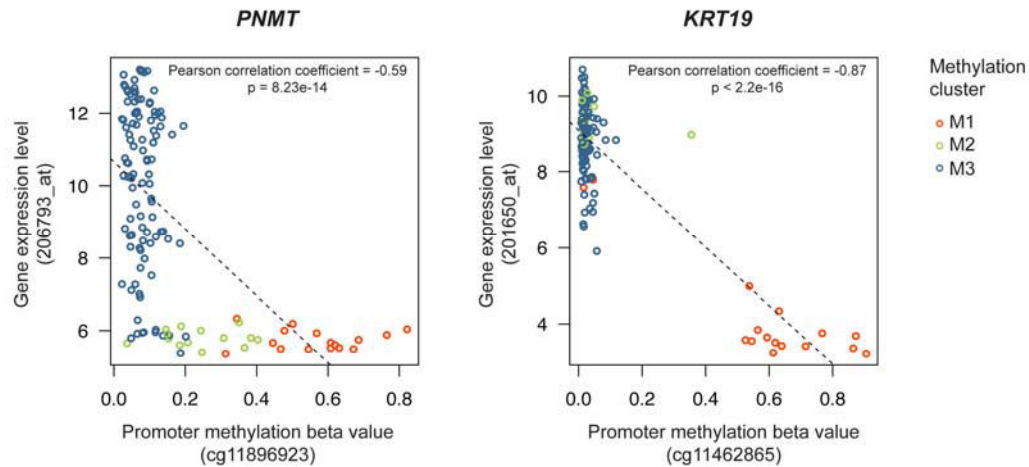


Figure S4, related to Figure 4. Correlation between promoter methylation and expression levels of *PNMT* and *KRT19*.

Promoter methylation and expression levels of *PNMT* and *KRT19* are represented for each tumor, with a colour code indicating consensus cluster memberships. Illumina DNA methylation probes used to assess promoter methylation, and Affymetrix probe sets used to assess gene expression, are indicated on the corresponding axes.

Table S10, related to Figure 5. Non-synonymous point mutations affecting exons or splice sites in tumor HS_121.

Chromosome	Position	Strand	Gene Symbol	Exon	Ref	Var	Mutation type	Uniprot ID	Amino acid index	Reference amino acid	Mutant amino acid	Polyphen prediction
chr1	33161085	-	SYNC	Exon 2	T	A	missense	Q9H7C4	205	E	V	probably damaging
chr1	43223576	-	LEPRE1	Exon 5	C	T	missense	Q32P28	320	A	T	probably damaging
chr1	46073437	+	NASP	Exon 6	C	T	missense	P49321	285	T	I	benign
chr1	155030873	+	ADAM15	Exon 15	C	G	missense	Q13444	625	Q	E	possibly damaging
chr1	223988509	-	TP53BP2	Exon 10	G	A	missense	B4DG66	410	S	F	benign
chr1	241667407	-	FH	Exon 7	C	G	missense	P07954	348	G	A	probably damaging
chr2	69206084	+	GKN1	Exon 4	T	G	missense	Q9NS71	110	S	A	benign
chr7	37955793	-	SFRP4	Exon 1	T	G	missense	Q6FHJ7	116	N	T	possibly damaging
chr7	148964188	+	ZNF783	Exon 4	A	C	missense + splice exon	Q6ZMS7	183	D	A	probably damaging
chr7	154746115	-	PAXIP1	Exon 16	C	T	missense	Q6ZW49	891	G	R	probably damaging
chr8	2813142	-	CSMD1	Exon 64	C	T	missense	F5GZ18	3321	M	I	benign
chr11	1993875	+	MRPL23	Exon 5	G	A	nonsense	Q16540	128	W	*	
chr12	82748300	-	CCDC59	Exon 3	G	C	missense	Q9P031	180	Q	E	probably damaging
chr12	82748302	-	CCDC59	Exon 3	A	T	missense	Q9P031	179	I	K	possibly damaging
chr13	43180690	+	TNFSF11	Exon 5	C	G	missense	O14788	197	S	C	probably damaging
chr13	106124975	+	DAOA	Exon 3	G	C	missense	P59103	74	Q	H	probably damaging
chr14	29237813	+	FOXG1	Exon 1	C	T	missense	P55316	443	T	M	probably damaging
chr14	79423621	+	NRXN3	Exon 8	T	C	missense	Q9Y4C0-3	398	L	P	probably damaging
chr19	9089785	-	MUC16	Exon 1	G	T	missense	B5ME49	677	S	Y	possibly damaging
chr20	37230621	+	ARHGAP40	Exon 1	G	A	missense	Q5TG30	12	M	I	not determined
chr22	28379474	-	TTC28	Exon 23	T	C	missense	Q96AY4	2061	I	V	possibly damaging

Ref: reference; Var: Variant

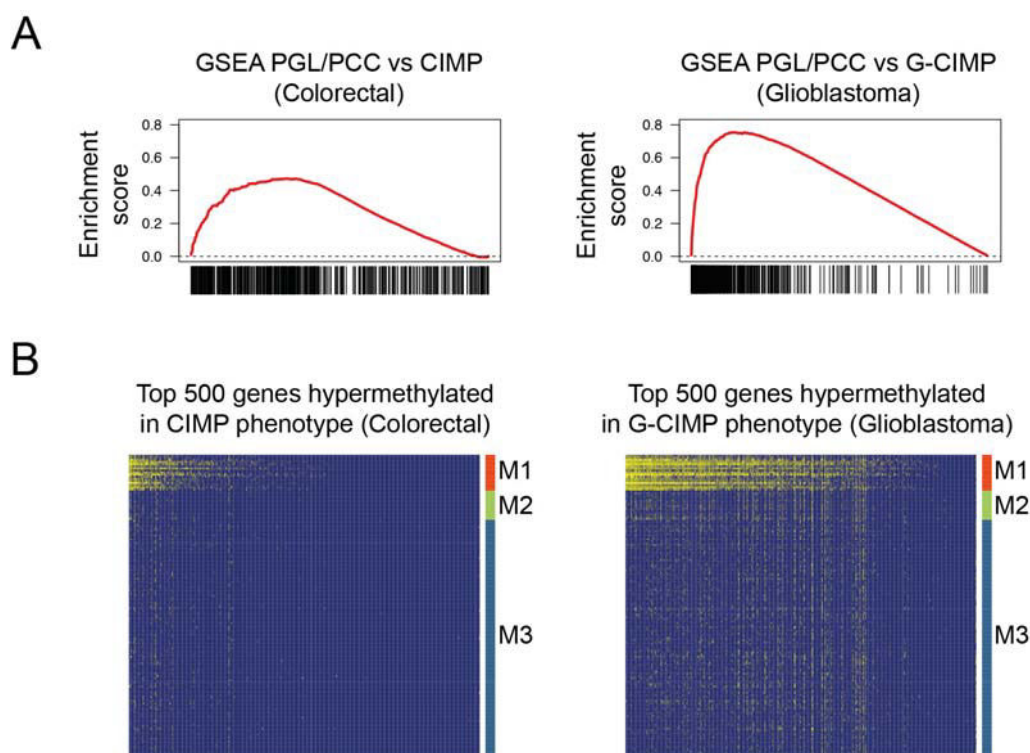


Figure S5, related to Figure 7. Concordance between hypermethylated sites in hypermethylated PGL/PCC, CIMP colorectal tumors and G-CIMP glioblastomas.

(A) Gene set enrichment analysis shows significant enrichment between genes hypermethylated in PGL/PCC and the top 500 genes most significantly hypermethylated in colorectal CIMP (left) and glioblastoma G-CIMP tumors. The enrichment score is higher between PGL/PCC and glioblastoma (0.75) than between PGL/PCC and colorectal cancer (0.47).

(B) Heatmap representation of PGL/PCC methylation profiles for the top 500 genes most significantly hypermethylated in colorectal cancer (left) and glioblastoma (right). PGL/PCC samples (lines) are ordered by methylation cluster. Probes (columns) are ordered according to their level of hypermethylation in M1 PGL/PCC.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES.

Collection and processing of PGL/PCC and normal tissue samples

The tumor and blood samples were collected prospectively by the French ‘Cortico et Médullosurrénale : les Tumeurs Endocrines’ (COMETE) network. The procedures used for pheochromocytoma/paraganglioma diagnosis were in accordance with institutional guidelines and have been described previously (Plouin and Gimenez-Roqueplo, 2006). Diagnosis was confirmed by histology in every case. Clinical and hormonal data gathered during work-up and follow-up were available for all but one patient. Tumor samples were obtained from patients with pheochromocytomas and/or abdominal or thoracic paragangliomas. Fresh tumor samples collected during surgery were immediately frozen and stored in liquid nitrogen until processing.

Genetic testing

Neurofibromatosis type 1 diagnosis was based on clinical criteria. Mutation analysis of the *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* and *MAX* genes was performed by direct sequencing of germline DNA for each patient. When direct sequencing was negative, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* and *MAX* were also analyzed for the presence of large deletions using the MLPA (SALSA MLPA P016[®] version C1 for *VHL* and SALSA MLPA P226[®] version B1 for *SDHx*, MRC Holland, The Netherlands) method (Burnichon et al., 2009) and a semi-quantitative multiplex-PCR method for *TMEM127* (Abermil et al., 2012) and *MAX* (Burnichon et al., 2012b). Mutation analysis for *SDHA* was performed retrospectively by direct sequencing and was limited to patients whose tumor presented a LOH as determined by BAC array CGH at the corresponding locus (5p15) (Burnichon et al., 2010) and/or was immunohistochemically negative for SDHA (Korpershoek et al., 2011). As mutations in the *SDHAF2* gene have only been described in patients with familial head and neck paragangliomas, we did not systematically analyze the *SDHAF2* gene in this study.

Gene expression data

Gene expression profiles for 134 of the 145 tumors included in this work were available from a previous study, in which we identified five stable PGL/PCC subgroups, significantly associated with clinical features and gene mutations (Burnichon et al., 2011). HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix GeneChip data from this previous study are available online as ArrayExpress entry E-MTAB-733 (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). The expression data for the 134 tumors included in the present work, normalized using the Robust Multi-array Average (RMA) method (Irizarry et al., 2003), were used to detect transcriptional modifications associated with DNA methylation changes.

RPMM classification of PGL/PCC DNA methylation profiles

For comparison with consensus clustering, we also classified our samples using the recursively partitioned mixture model (RPMM), developed for beta-distributed DNA methylation measurements (Houseman et al., 2008). RPMM-based clustering was performed as implemented in the Bioconductor *RPMM* package, with default settings, using the same 2,152 probes used for consensus clustering. Consensus cluster assignments and RPMM-based cluster assignments for each sample are summarized in Supplemental Table 1 and compared in Figure S2.

Comparison of CIMP phenotypes between different cancers

We used published DNA methylation data from 125 colorectal tumors (Hinoue et al., 2012) and 91 glioblastoma samples (Noushmehr et al., 2010) to compare the PGL/PCC hypermethylator phenotype with the colorectal CIMP and glioma G-CIMP phenotypes. CIMP-specific hypermethylated loci were identified in each cancer type as those probes with a mean beta value difference >0.2 between CIMP and non-CIMP tumors. We used a fixed beta value threshold rather than a statistical test because the sample size, hence the statistical power, differed between the three data sets. Fisher's exact tests were used to compare CIMP-specific hypermethylated loci between cancer types. We also used Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (Subramanian et al.,

2005)) to assess whether the set of genes hypermethylated in M1 PGL/PCC was enriched in genes belonging to the 500 genes most significantly hypermethylated in colorectal CIMP tumors, and in glioblastoma G-CIMP tumors.

Whole-exome sequencing

Exome sequencing was performed by IntegraGen as previously described (Guichard et al., 2012). In brief, Agilent in-solution enrichment (SureSelect Human All Exon Kit v4+UTR) with the provided biotinylated oligonucleotide probe library (Human All Exon v4+UTR–70 Mb) was used for DNA sequence capture, enrichment and elution from the tumor and matched blood DNA samples. The eluted fraction was amplified by PCR and sequenced on an Illumina HiSeq2000 sequencer as paired-end 75-bp reads (Gnirke et al., 2009). Image analysis and base calling were performed using the Illumina Real Time Analysis (RTA) Pipeline version 1.12.4.2 with default parameters. Initial analysis of whole-exome sequencing was based on the Illumina pipeline (CASAVA1.8.2) and used the hg19 reference genome. The alignment algorithm used was ELANDv2. The regions targeted in each sample were sequenced to an average depth of 73.5×, with 99% of the targeted regions covered $\geq 1\times$, 93.0% covered $\geq 10\times$ and 81% covered $\geq 25\times$. A list of reliable nonsynonymous variants located in coding regions was generated as previously described (Guichard et al., 2012). Common polymorphisms were removed by comparison to dbSNP132, 1000 Genomes Project data and the IntegraGen in-house database. Quality control filtering removed variants sequenced in fewer than five reads or with QPHRED of <10 . All putative somatic mutations were validated visually using the Integrated Genomics Viewer (Robinson et al., 2011). The germline and somatic mutations in *FH* gene were validated by Sanger sequencing.

Statistical analysis

R software V2.15.0 (<http://www.R-project.org>) and Bioconductor packages were used for statistical analysis and data visualization. Chi-square tests were used to assess the significance of association between various covariates and DNA methylation clusters.

We used the non-parametric Wilcoxon rank-sum test to identify CpG sites with significantly different methylation beta values, and genes with significantly different expression levels, between tumor subgroups. The hypergeometric test was used to identify enriched gene ontology (GO) terms in the set of epigenetically silenced genes. False-discovery rate (FDR)-adjusted p-values were calculated using the Benjamini and Hochberg procedure for multiple testing correction (Benjamini and Hochberg, 1995). Metastasis-free survival (MFS) and overall survival (OS) were analyzed for each DNA methylation cluster, and the significance of the separation between Kaplan-Meier curves was evaluated using a logrank test. The Fisher's exact test was used to assess the overlap between gene lists (e.g. hypermethylated and down-regulated genes, or genes hypermethylated in human tumors and mouse cell lines).

Mouse genotyping

Mice and cells were genotyped by PCR with total genomic DNA using the following primers: *Sdhb*-F (5'CCATGCCAGTAACCCCAGAATTGG 3') and *Sdhb*-R (5'GTCCCACCTCACTGTAGGTCAC 3), which amplify all of the native (845bp), floxed (950bp) and deleted (460bp) alleles.

Assessment of enzymatic activities

Respiratory chain activities in subconfluent chromaffin cells were assayed as previously described (Rustin et al., 1994). Malonate-sensitive succinate dehydrogenase (RC complex II; E.C. 1.3.5.1), glycerol 3 phosphate dehydrogenase (EC 1.1.5.3), cyanide-sensitive cytochrome *c* oxidase (RC complex IV; EC 1.9.3.1), malonate-sensitive succinate cytochrome *c* reductase (RC complex II+III; EC 1.3.99.1), and glycerol cytochrome *c* reductase (glycerol 3-phosphate dehydrogenase + RC complex III) were assayed spectrophotometrically at 37°C using a pseudo dual-wavelength Varian CARY50 spectrophotometer (Victoria, Australia) as described previously (Benit et al., 2006). Fumarase activity was analyzed in sample HS_121 (harboring *FH* mutations) and six control PGL/PCC. The forward reaction (fumarate to malate) was spectrophotometrically measured by following at 340 nm the

reduction of 1.5 mM NAD⁺, triggered by 35 the addition of mM fumarate, in the presence of 2 IU of added malate dehydrogenase and aspartate amino transferase, 5 mM glutamate and 8 μM rotenone, in a hypo-osmotic 10 mM phosphate buffer (pH 7.2). Enzymatic activity in the backward direction (malate to fumarate) was also measured by following at 240 nm the accumulation of fumarate under standard conditions (Bergmeyer, 1963). Protein concentrations were determined by the Bradford method. All chemicals were analytical reagent grade from Sigma Chemical Company.

Immunofluorescence

Cells were cultured on glass coverslips until confluence, permeabilized in 1X PBS with 0.2% Triton X-100 for 10 min and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies in PBS plus 0.1% Tween and 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Samples were incubated for 2h at RT with specific secondary antibodies (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG and Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Rabbit IgG, Invitrogen), and mounted on a glass slide using Vectashield mounting media for fluorescence (Vector Laboratories). For IF analyses, the following antibodies were used: anti-5methylcytosine (1:1000, Calbiochem, 162 33 D3), anti-5-hydroxymethylcytosine (1:250, Active Motifs, 39759), anti-HIF2α (1:300, Abcam, ab199) and anti-HIF1α (1:1000, Abcam, ab1). Fluorescence images were acquired on a Zeiss Axio Observer Z1 inverted fluorescence microscope.

Organic acid assays

Aliquots of 120 μl of suspensions of cell pellets (1.89-7.24 μg/μl protein) and the supernatant (1 ml) from imCCs cultures were processed. Twenty-four nmoles of 4-phenylbutyric acid (P21005, Sigma-Aldrich) was added to each sample as an internal standard. The organic fraction was extracted with ethylacetate, derivatized using N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane, and analyzed by gas chromatography-tandem mass spectrometry on a GC 450/300-MS triple quadrupole from Brüker Daltonics (formerly Varian). All organic acids were identified according to retention time and mass spectrum using standard spectral

reference libraries. Succinic, malic and fumaric acids were quantified relative to 4-phenylbutyric acid in full scan mode.

Western Blot

Total protein extracts were prepared in modified RIPA lysis buffer (50 mM Tris at pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM EDTA at pH 8.0, 1 mM EGTA, and protease inhibitors). Histone acid extractions were performed as described elsewhere (Lu et al., 2012). Equal quantities of proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane (Amersham), and probed with primary antibodies at 4°C overnight in PBS, 0.05% Tween-20, and 5% nonfat dry milk or 2% BSA. Membranes were rinsed three times in PBS and incubated with horseradish-peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (BioFX, 316-120-02 and 410-120-02). Chemiluminescence was developed by ECL (Pierce) and results read with a LAS-4000 Mini (Fuji) with the Image Reader V1.4E and Image Gauge V3 programs (Fuji). The following primary antibodies were used: anti-SDHB (1:1000, Abcam, ab14714), anti-SDHA (1:2000, Abcam, ab14715), anti-H3K9me2 (1:1000, Active Motifs, 39240), anti-H3K9me3 (1:1000, Active Motifs, 39161), anti-H3K27me2 (1:1000, Active Motifs, 39919), anti-H3K27me3 (1: 1000, Active Motifs, 39155), and anti-Histone 3 (1:1000, Active Motifs, 39163F).

Cell Migration assay

Cells were treated with Decitabine (A3656, Sigma Aldrich), during 72 hours with a daily fresh prepared and filtered solution. Drug was resuspended in DMSO and diluted in culture medium; not-treated cells received medium with equivalent amount of DMSO only. Two concentrations of Decitabine were used, a classical dose of 5 μM , and a very low dose of 10 nM. After 3 days of treatment, drug was removed and cells were confluent seeded in 6-well dishes and maintained in standard medium conditions. Twenty-four hours after passage, a wound was made and cells were allowed to grow in, in standard medium for 10 hours. Relative cell migration was

established by calculating the closure index, based on the analysis of 10 pictures for each time point and condition using ImageJ software, as described (Liu et al., 2012).

Flow cytometry

Aliquots of 10^6 cells were analyzed for 5-meC by flow cytometry. Cells were fixed and permeabilized with Cytoperm/Cytofix solution (BD Biosciences) for 20 min on ice. They were then incubated for 30 minutes with anti-5meC (1/20, Active Motif), at room temperature and washed twice in Perm/Wash solution (BD Biosciences). The secondary antibody, conjugated to APC 647, was added and the samples incubated for 30 min in the dark (1/20, Invitrogen). The cells were washed in Perm/Wash and analyzed in PBS, using a 3.1.3 BD LSR™ II flow cytometer. Data were explored with FCS Express 4 Flow software (research edition).

Immunohistochemistry

Sections 6-micrometres thick were cut from 39 paraffin-embedded tumor samples (Table S2) and mounted on Superfrost plus slides. The following antibodies and a standard procedure were used for immunohistochemistry (Favier et al., 1999) with Histogreen as a chromogen: anti-5-methylcytosine (1:1000, Calbiochem, 162 33 D3), anti-5-hydroxymethylcytosine (1:250, Active Motifs, 39759), anti-H3K9me2 (1:1000, Active Motifs, 39240), and anti-H3K9me3 (1:1000, Active Motifs, 39161). Antigen retrieval was performed by boiling slides in Tris-EDTA buffer (pH9) for 45 min for 5-mC and in citrate buffer (pH6) for 5-hmC. Tumors were sorted blindly, according to 5-hmC staining in tumor cells versus endothelial cells using the following score: 'low 5-hmC' = high endothelial staining, no tumor labeling or tumor labeling markedly inferior to endothelial labeling, 'high 5-hmC' = tumor labeling slightly inferior or equivalent to endothelial labeling. For methylated histones, tumors were sorted blindly using a 4-point scale (0 to 3) for the intensity of nuclear staining in tumor cells. Images were acquired with a Leica DM400B microscope with Leica Application Suite software version 2.8.1, and a Leica DFC420C camera.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Abermil, N., Guillaud-Bataille, M., Burnichon, N., Venisse, A., Manivet, P., Guignat, L., Drui, D., Chupin, M., Josseume, C., Affres, H., *et al.* (2012). TMEM127 screening in a large cohort of patients with pheochromocytoma and/or paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E805-809.

Benit, P., Goncalves, S., Philippe Dassa, E., Briere, J. J., Martin, G., and Rustin, P. (2006). Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. *Clin Chim Acta* 374, 81-86.

Bergmeyer, H. U. (1963). *Methods of Enzymatic Analysis*.

Burnichon, N., Briere, J. J., Libe, R., Vescovo, L., Riviere, J., Tissier, F., Jouanno, E., Jeunemaitre, X., Benit, P., Tzagoloff, A., *et al.* (2010). SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet* 19, 3011-3020.

Burnichon, N., Rohmer, V., Amar, L., Herman, P., Leboulleux, S., Darrouzet, V., Niccoli, P., Gaillard, D., Chabrier, G., Chabolle, F., *et al.* (2009). The succinate dehydrogenase genetic testing in a large prospective series of patients with paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(8):2817-27.

Favier, J., Kempf, H., Corvol, P., and Gasc, J. (1999). Cloning and expression pattern of EPAS1 in the chicken embryo. Colocalization with tyrosine hydroxylase. *FEBS Lett* 462, 19-24.

Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E. M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., *et al.* (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 27, 182-189.

Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., *et al.* (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 44, 694-698.

Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., and Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)* 4, 249-264.

Korpershoek, E., Favier, J., Gaal, J., Burnichon, N., van Gessel, B., Oudijk, L., Badoual, C., Gadessaud, N., Venisse, A., Bayley, J. P., *et al.* (2011). SDHA immunohistochemistry detects germline SDHA gene mutations in apparently sporadic paragangliomas and pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E1472-1476.

Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. (2012). *Nature* ;483(7390):474-8.

Liu W, Monahan KB, Pfefferle AD, Shimamura T, Sorrentino J, Chan KT, Roadcap DW, Ollila DW, Thomas NE, Castrillon DH, *et al.* LKB1/STK11 inactivation leads to expansion of a prometastatic tumor subpopulation in melanoma. (2012). *Cancer Cell*. 21(6):751-64.

Plouin, P. F., and Gimenez-Roqueplo, A. P. (2006). Initial work-up and long-term follow-up in patients with pheochromocytomas and paragangliomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20, 421-434.

Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., and Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29, 24-26.

Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., and Munnich, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228, 35-51.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-15550.

3. Discussion et perspectives

La SDH, l'IDH et la FH sont trois des enzymes du cycle de Krebs pour lesquelles un lien direct entre mutation d'un gène et tumorigenèse est clairement établi. Jusqu'à très récemment, l'état des connaissances ne permettait d'expliquer la tumorigenèse *SDH*-dépendante que par la stabilisation des HIFs causée par l'inhibition des PHDs par le succinate. Très récemment, Xiao et al. ont décrit le rôle du succinate et du fumarate dans l'inhibition des dioxygénases dépendante de l' α -KG, notamment les PHDs, les TETs, les KDMs et les CPH. Ils ont décrits ces résultats dans les cellules Hela (dérivées d'une tumeur cervicale) et HEK293T (cellules rénales embryonnaires) présentant une inactivation respectivement transitoire et stable des gènes *SDHA*, *SDHB* ou *FH* obtenue par une stratégie d'ARN interférence. Durant le processus de révision de notre publication par la revue *Cancer Cell*, Killian et al. ont comparé les profils de méthylation de GIST porteurs de mutations sur les gènes *SDHx* et sur le gène *ckit*. Ils ont observé un phénomène d'hyperméthylation de l'ADN consécutif à l'inactivation de la succinate déshydrogénase et validé cette donnée par immunohistochimie, en observant une perte d'expression de la 5hmcC sur des coupes de GIST *SDHx*-mutés. Ils ont par ailleurs décrit un phénomène équivalent dans un sous-groupe de 20 PCC/PGL porteurs de mutations sur les gènes *SDHx* [396]. L'ensemble de nos résultats ainsi que ceux publiés par Xiao et al., ainsi que par Killian et al., permettent donc d'attribuer au succinate un rôle majeur dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes *via* l'inhibition des enzymes TETs et KDMs. Ainsi, tout comme le 2-HG, le succinate fait partie des oncométabolites, dont le spectre d'action large permet d'expliquer aujourd'hui un peu plus le rôle dans la tumorigenèse des PCC/PGL. Par ailleurs, dans cette étude, le premier cas de mutation du gène *FH* a été mis en évidence chez une patiente ayant développé un PCC, et présentant un profil de méthylation équivalent aux tumeurs *SDHx*. Succinate, fumarate et 2-HG sont donc des oncométabolites capables d'induire un phénotype hyperméthylateur dans les tumeurs. Les prochains enjeux seront donc l'identification des voies moléculaires ainsi modulées (comme cela a été le cas pour l'EMT par exemple), afin de mieux comprendre l'implication de cette hyperméthylation dans le phénotype tumoral. D'autres part, le succinate se comporte comme un inhibiteur compétitif des enzymes dépendantes de l' α -KG, dont il existe plus d'une soixantaine de types chez les mammifères et qui sont donc également susceptibles d'être inhibées dans un contexte de déficience en SDH (ou FH). Il serait ainsi particulièrement intéressant d'étudier si parmi ces enzymes, d'autres pourraient présenter des caractéristiques relevantes quant à la tumorigenèse des PCC/PGL.

La malignité *SDHB*-dépendante présente des particularités, dont l'activation de la voie de l'EMT. L'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la malignité nécessite donc un modèle d'étude adapté. Jusqu'à présent seuls trois modèles cellulaires de PCC/PGL existaient (voir ci-dessus), mais aucun ne présentait d'inactivation du gène *Sdhb*. Certaines études utilisent la technique d'extinction génique par siRNA, mais à nouveau l'inactivation du gène n'est pas complète et une activité SDH reste toujours existante. Nous disposons désormais du premier modèle de cellules chromaffines porteuses d'une inactivation complète du gène *Sdhb*, validée au niveau protéique, par dosage de l'activité SDH et par dosage de l'accumulation de succinate. L'intérêt majeur de ce modèle est de disposer d'un outil qui reproduit les caractéristiques des mutations *SDHB* observées dans les tumeurs des patients. En effet ce modèle reproduit l'activation de la pseudo-hypoxie, ainsi que le phénotype hyperméthylateur (hyperméthylation de l'ADN et des histones) et nous a d'ores et déjà permis de montrer que ce phénomène d'hyperméthylation était probablement réversible par supplémentation en α -KG. Nos premières analyses fonctionnelles concernant la

migration des cellules ont montré que les cellules *Sdhb*^{-/-} possédaient des capacités migratoires accrues, ce qui pourrait suggérer une activation de l'EMT dans ces cellules. Par ailleurs, les résultats observés après un traitement court (72h) par un agent déméthylant utilisé en clinique suggèrent que la réversion partielle de ce phénotype est possible. Ces données préliminaires ouvrent de nouvelles options thérapeutiques envisageables pour les patients atteints de PCC/PGL, qui comme les patients atteints de leucémies pourraient potentiellement recevoir des thérapies déméthylantes. D'autre part, l'existence de ce modèle, permet d'envisager des études cellulaires *in vitro* plus complexes d'analyses de voies moléculaires impliquées dans la tumorigenèse *SDHB*-dépendante. Il ouvre également la voie vers des études *in vivo*, et par exemple des essais précliniques après xénogreffes de ces cellules chez la souris. Indépendamment, la connaissance du statut hyperméthylé des tumeurs *SDHB* malignes s'avère également très utile comme outil de prédiction de réponse au traitement par le témozolomide. En effet, la MGMT qui assure la réparation des cassures doubles brins de l'ADN, induites par les drogues comme le témozolomide, est sous-exprimée dans ces tumeurs suite à la méthylation de son promoteur. Ainsi son absence d'expression permet une amélioration de la réponse à ce traitement (*cf.* Annexe II) [243].

III. RÔLES DE KRT19 DANS LE PHENOTYPE DES CELLULES *SDHB*^{-/-}

1. Contexte

A. Résultats préliminaires

En nous basant sur les gènes associés à l'EMT utilisés pour l'étude de cette voie dans les tumeurs humaines, nous avons établi une liste de 102 gènes (comprenant les 94 initiaux ainsi que des homologues) que nous avons utilisés pour une analyse comparée de l'activation de l'EMT dans les cellules *Sdhb*^{-/-}. Nous avons généré des données de transcriptome de ces cellules et de leurs contrôles sauvages et ainsi pu valider que les imCC *Sdhb*^{-/-} présentent une activation de la voie de l'EMT caractérisée par l'induction de *Lox*, *Snai1*, *Snai2*, *Twist2*, *Ctnnb1*, *Frzd7*, *Tgfb3*, *Mmp2*, *Mmp3*, *Mmp9* and *Smad1*, et par la diminution d'expression de *Krt18*, *Krt19*, *Krt8* et *Cdh2*. En revanche nous n'avons pas observé de différence d'expression des facteurs ZEBs.

J'ai alors entrepris la caractérisation complète de l'EMT dans ce modèle. Dans un premier temps j'ai validé par qPCR les données transcriptomiques obtenues pour *Twist1*, *Twist2*, *Tcf3*, *Snai1*, *Krt19*, *Cdh1*, *Cdh2*, *Mmp2* et *Mmp9* (Figure 48A). Au niveau protéique, j'ai pu démontrer l'importante diminution de la N-cadhérine et de la kératine 19, ainsi qu'une induction de TCF3 et de SNAI1 dans les cellules *Sdhb*^{-/-} comparativement aux cellules contrôles. Une étude de zymographie m'a par ailleurs permis de valider l'induction des MMP2 et MMP9 (Figure 48B, C et D).

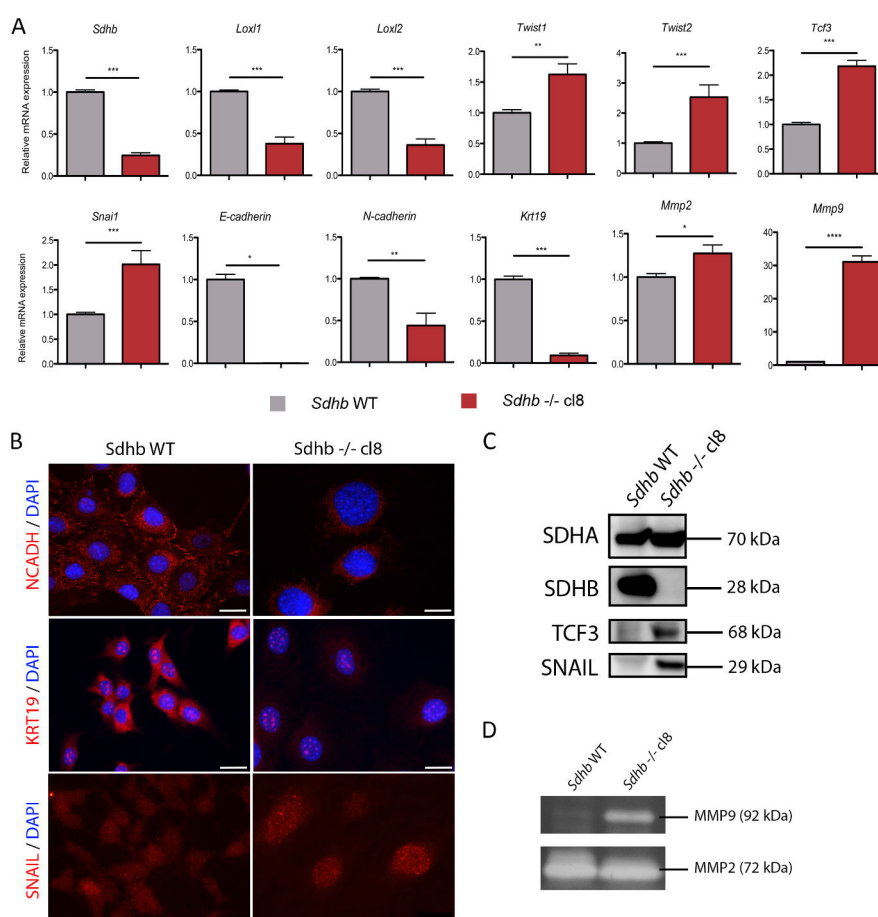


Figure 48 : Validation de l'induction de l'EMT dans les cellules *Sdhb*^{-/-}. Validation transcriptionnelle par qPCR (A) ; validation protéique par immunofluorescence (B), par Western blot (C) et par zymographie (D).

B. La kératine 19

La kératine 19 est la plus petite des 54 cytokératines existantes. C'est une protéine de la superfamille des filaments intermédiaires du cytosquelette [397], impliquée dans la formation des jonctions cellulaires de types desmosomes et hémi-desmosomes, perdues au cours de la progression tumorale [398]. La kératine 19 présente un intérêt particulier en cancérologie, puisqu'elle est notamment utilisée comme un marqueur de diagnostic des cellules cancéreuses mammaires circulantes [399].

De manière particulièrement intéressante, et comme nous l'avons remarqué dans les PCC/PGL *SDHB* mutés, différentes études ont rapporté une perte d'expression du gène *KRT19*, associée à un mauvais pronostic chez les patients. Ceci a notamment été décrit dans des cas de neuroblastomes, de cancers mammaires ou de carcinomes épidermoïdes, mais également dans des lignées cellulaires tumorales, ou cette diminution d'expression était associée au phénotype métastatique des cellules, caractérisé par des propriétés migratoires et invasives accrues [400-405].

Par ailleurs, et à nouveau comme nous avons pu l'observer dans le cadre des PCC/PGL, l'extinction du gène *KRT19* a été démontrée comme la conséquence d'une hyperméthylation de son promoteur, dans des cas de carcinomes rénaux, ou utérins [403, 406, 407]. De plus, dans un contexte de neuroblastome, de même origine embryonnaire que les PCC/PGL, la méthylation du promoteur *KRT19* a été associée aux tumeurs de plus haut grade, et donc à une réduction de la survie des patients [401, 402].

Ayant validé notre modèle d'étude comme mimant certaines caractéristiques de l'EMT décrites dans les tumeurs humaines aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau protéique, j'ai donc poursuivi cette étude par une analyse plus fonctionnelle des propriétés migratoires, invasives et adhérentes des cellules. Puis j'ai focalisé mon étude sur la kératine 19 pour décrire plus précisément ses rôles et implications dans ces différents phénomènes.

2. Article 3 : Implication de la KRT19 dans le phénotype métastatique *Sdhb*-dépendant

A. Résumé

Les cellules *Sdhb*^{-/-}, comme les tumeurs *SDHB*-mutées présentent, une hyperméthylation globale de l'ADN. Parmi les gènes hyperméthylés dans les cellules, nous avons retrouvé des gènes associés à l'EMT, et notamment le gène *Krt19* qui est, également dans ce modèle cellulaire, l'un des gènes les plus méthylés.

Lorsque le promoteur du gène *Krt19* est hyperméthylé, il en résulte une très faible transcription qui se traduit par une expression protéique quasi-nulle dans les cellules *Sdhb*^{-/-}. Des traitements utilisant des agents déméthylants de l'ADN et des histones m'ont permis de montrer que ce phénomène était réversible. J'ai alors étudié les caractéristiques fonctionnelles de l'activation de l'EMT dans ces cellules, puis modulé l'expression de *Krt19* dans les cellules sauvages (WT) et dans les cellules *Sdhb*^{-/-} afin de déterminer les implications de cette protéine.

Des analyses de « wound scratch » et de suivi individuel des cellules m'ont permis de montrer que les cellules *Sdhb*^{-/-} présentaient des capacités migratoires collectives et individuelles supérieures aux cellules contrôles. Les cellules contrôles présentaient par ailleurs une migration individuelle « sur

elle-même » et donc une distance absolue parcourue plus courte. Par l'étude de l'invasion des cellules à travers une matrice de Matrigel®, j'ai mis en évidence des propriétés invasives accrues des cellules *Sdhb*^{-/-}, notamment caractérisées par une plus grande habilité à passer à travers un filtre, et par une distance d'invasion au-delà de ce filtre plus longue. D'autre part j'ai pu décrire un phénomène d'adhésion beaucoup plus rapide des cellules *Sdhb*^{-/-}, comparativement aux cellules contrôles.

Afin d'étudier les conséquences de la perte de la KRT19 dans les cellules *Sdhb*^{-/-}, j'ai réintroduit le gène *Krt19* dans les cellules en utilisant une approche d'infection lentivirale. J'ai ainsi observé que la réintroduction de la KRT19 dans ces cellules avait pour conséquences une réduction de la migration collective, une diminution de la vitesse individuelle, une tendance à la diminution de l'invasion cellulaire, ainsi qu'une réduction de l'adhésion cellulaire. En revanche ces modulations ne sont que partielles et n'ont pas permis un retour aux niveaux observés dans les cellules *Sdhb* sauvages. Afin de conforter ces analyses, j'ai également réalisé une extinction du gène *Krt19*, en utilisant une stratégie d'ARN interférent (siRNA), dans les cellules *Sdhb* WT. J'ai ainsi pu observer que l'inhibition de la KRT19 avait un impact sur l'adhésion des cellules qui se trouvait augmentée après extinction du gène. En revanche je n'ai pas pu mettre en évidence d'effet sur la migration collective, restée inchangée, démontrant que la baisse d'expression de la KRT19 dans les cellules *Sdhb*^{-/-} est partiellement nécessaire à leur migration, mais qu'elle n'est pas suffisante pour induire ce processus dans des cellules sauvages.

Ces résultats nous ont donc permis de décrire pour la première fois, dans un modèle de cellules chromaffines présentant une inactivation du gène *Sdhb*, (1) l'activation de la voie de l'EMT consécutive à la perte de l'expression du gène *Sdhb* ; (2) les conséquences fonctionnelles de cette activation (augmentation de la migration, de l'invasion et de l'adhésion cellulaires) ; (3) l'implication spécifique de la KRT19 dans ces processus.

B. Article 3

Loriot C., et al.

“Epigenetic extinction of Keratin 19 participates to the invasive phenotype of *Sdhb*-deficient cells.”

Manuscrit en préparation

REPORT

Epigenetic extinction of Keratin 19 participates to the invasive phenotype of *Sdhb*-deficient cells.

Céline Lorient^{1,2}, Mélanie Domingues^{2,4}, Adeline Berger^{5,7}, Mélanie Menara^{1,2}, Cosimo Martinelli^{1,2}, Alexis Bemelmans^{8,9}, Lionel Larue^{2,4}, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo^{1,2,3}, Judith Favier^{1,2}

1. INSERM, UMR970, Paris Cardiovascular Research Centre, F-75015 Paris, France
2. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France
3. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, F-75015 Paris, France
4. INSERM U1021, CNRS UMR3347, Institut Curie, F-91405 Orsay, France
5. INSERM, U968, Institut de la vision, F-75012 Paris, France
6. Rare Adrenal Cancer Network-Cortico Médullosurrénale Tumeur Endocrine, Institut National du Cancer, F-75014 Paris, France
7. Université Pierre et Marie Curie Paris 06, F-75005, Paris France
8. CEA, DSV, I²BM, Molecular Imaging Research Center (MIRcen), Fontenay-aux-Roses, F-92265, France
9. CNRS, CEA URA 2210, Fontenay-aux-Roses, F-92265, France

Correspondence:

Dr. Judith Favier

Centre de recherche cardiovasculaire de l'HEGP

56 rue Leblanc 75015 Paris

E-mail: judith.favier@inserm.fr

Tel: 01 53 98 80 41

Fax: 01 53 98 79 52

Running title: *Sdhb* deficiency mediates metastatic phenotype

Number of characters:

Summary

Pheochromocytomas and paragangliomas are rare neuroendocrine tumors for which heritable *SDHB*-gene mutations are a risk factor of malignancy and bad prognosis. *SDHB*-malignant tumors were previously characterized by the induction of epithelial to mesenchymal transition (EMT), and by their hypermethylator phenotype. Among the hypermethylated genes, *KRT19*, an EMT associated gene, which encodes keratin 19 (a cytoskeleton protein), was one of the most hypermethylated and downregulated in *SDHB*-malignant tumors. Here we highlighted in *Sdhb* deficient chromaffin cells, the consequences of this EMT activation, consecutive to SDHB loss. We demonstrated that *Sdhb* deficient cells displayed enhanced individual migration, associated with faster motility, high invasive and adhesive abilities. We described the hypermethylation and down regulation of *Krt19* in these cells, and studied the implication of this protein in the metastatic phenotype of *Sdhb* deficient cells. We thus observed its implication in collective and individual migration and in adhesion abilities. However this effects did not induce a complete reversion of the phenotype, suggesting that others partners are involved in the establishment of this EMT-like phenotype.

Introduction

Pheochromocytomas (PCC) and paragangliomas (PGL) are rare neuroendocrine tumors that arise from neural crest derived cells of the adrenal medulla (chromaffin cells) or of sympathetic and parasympathetic ganglia, respectively. In about 30-40% of cases, PCC and PGL are genetically determined, which implies that a mutation has been identified in one of the 12 known PCC/PGL predisposing genes: the *RET* proto-oncogene and 11 tumor suppressor genes: *NF1*, *VHL*, *SDHx* genes (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* and *SDHAF2*), *MAX*, *TMEM127* and *FH* (Astuti et al., 2001; Baysal et al., 2000; Burnichon et al., 2010; Comino-Mendez et al., 2011; Hao et al., 2009; Latif et al., 1993; Letouze et al., 2013; Mulligan et al., 1993; Niemann and Muller, 2000; Qin et al., 2010; Wallace et al., 1990). Somatic mutations in predisposing genes (*NF1*, *VHL*, *MAX*, *HIF2A*) (Burnichon et al., 2012a; Burnichon et al., 2012b; Burnichon et al., 2011; Zhuang et al., 2012), or in the recently identified *HRAS* (Crona et al., 2013) have also been identified in 20-30% of cases.

Among PCC/PGL predisposing genes, *SDHB* is specifically associated with malignancy and poor prognosis. Patients carrying an *SDHB* mutation are more likely to develop a metastatic form of their disease, and their median survival is substantially reduced, compared to patients with a metastatic disease but without *SDHB* mutation. Time laps between diagnosis and development of metastasis is shorter for *SDHB* mutation carriers than others (for whom it can last up to 20 years) (Amar et al., 2007; Gimenez-Roqueplo et al., 2003). Recent studies have demonstrated that *SDHx* mutations lead to succinate dehydrogenase (SDH) inactivation and succinate accumulation (Briere et al., 2005; Selak et al., 2005), which is responsible for a global hypermethylation of DNA. Succinate inhibits DNA oxidative demethylation through the inactivation of DNA demethylases (TETs enzymes), which are 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (Letouze et al., 2013; Xiao et al., 2012). We previously proposed epithelial to mesenchymal transition (EMT) as the process likely to be responsible for *SDHB*-related malignancy in PCC/PGL. Using transcriptome profiling of a large cohort of PCC/PGL, we indeed reported that *SDHB*-malignant samples displayed an overexpression of *LOXL2*, *TWIST1*, *TCF3*, *MMP1*, *MMP2* and a downregulation of *CDH2* and *KRT19*, which are all, hallmarks of the EMT

process. Furthermore, the nuclear retention of SNAIL was specifically observed in *SDHB*-malignant tumors, suggesting an active form of this key EMT transcription factor in this subgroup of PCC/PGL (Loriot et al., 2012). Following these initial data, we demonstrated that *KRT19* was one of the most hypermethylated and downregulated genes found in *SDHB*-mutated tumor samples as compared to other PCC/PGL (Letouze et al., 2013).

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a physiological embryonic process that allows, among others, neural crest cells migration after neural tube closure. It can also be found in pathological conditions such as fibrosis (Iwano et al., 2002) and metastatic dissemination (Thiery, 2002). Cancer cells, which are submitted to EMT, undergo changes responsible for the loss of cell junctions, increased proteolytic abilities and enhanced migratory and invasive skills (Kalluri and Weinberg, 2009). During malignant progression, tumor cells thus lose cell/cell and cell/ECM adhesion properties, which can be assessed by actin-dependent focal adhesion, or keratins-dependent hemidesmosomes (Seltmann et al., 2013). Keratins (also called cytokeratins) are part of intermediate filaments (IF), the most complex group of proteins composing the cytoskeleton (along with tubulin microtubules and actin filaments). There are 65 functional genes that encode 5 different groups of proteins composing IF: type I comprises acidic keratins; type II basic (or neutral) keratins; type III is composed of vimentine, desmin, glial fibrillary acidic protein, syncoilin and peripherin; type IV encompasses neurofilaments, α -internexin, nestin and synemin and finally, type V contains nuclear lamins, orphan included phakinin and filensin (Omary et al., 2004). Keratin filaments are heterodimers of type I and type II proteins (Hendrix et al., 1996). Among the 54 keratins (Schweizer et al., 2006), keratin 19 (KRT19) is the smallest one, and is of peculiar interest because of its implication as a diagnostic marker of circulating cells in breast cancer (Androulakis et al., 2012). Interestingly, several studies reported a link between the loss or the downregulation of KRT19 in tumor samples and in cell lines, and respectively, an aggressive behavior or a metastatic phenotype (characterized by enhanced migratory, adhesive and invasive properties). This was observed in squamous carcinoma cells (SCC), neuroblastomas, in renal and breast cancers (Caren et al., 2011;

Crowe et al., 1999; Ju et al., 2013; Morris et al., 2008; Nozato et al., 2013; Tripathi et al., 2005). *KRT19* extinction seemed to be due to the methylation of its promoter, as described in uterine leiomyoma samples and renal cell carcinoma samples (Morris et al., 2008; Navarro et al., 2012; Paiva et al., 2011). Remarkably, the downregulation of *KRT19* was also correlated with its promoter methylation in neuroblastomas, which are (as PCC and PGL) neural crest cell derived tumors. This was described to be associated with high grades tumors, and thus with reduced patients' survival (Caren et al., 2011; Nozato et al., 2013).

Following our initial observation of an epigenetically-mediated extinction of *KRT19* in human *SDHB*-deficient PCC/PGL, we herein evaluated the role of *KRT19* in the establishment of a metastatic phenotype following *in vitro* inactivation of *Sdhb* in murine chromaffin cells.

Results

***Sdhb* ^{-/-} immortalized mouse chromaffin cells display increased migratory and invasive properties**

We recently reported an increase in collective migration in immortalized mouse chromaffin cells (imCC) harboring a complete inactivation of the *Sdhb* gene as compared to their wild-type (WT) counterparts (Letouze et al., 2013). In order to extend these initial observations, we next assessed cell migration by following cells individually using single cell tracking (Figure 1A and supplemental videos S1-3). We evaluated individual cell speed, mean distance, and directionality over a 12h period of time. We observed that *Sdhb* ^{-/-} cells migrate at a 22μm/h speed, which is significantly faster ($p=0.0003$) than control cells (17μm/h) (Figure 1A). As a result of enhanced individual cell speed, total distance was significantly higher in *Sdhb* ^{-/-} cells compared to WT cells. Interestingly, vector diagram representation of cells directionality revealed that WT cells nonetheless migrate less but also tend to go in circles while *Sdhb*-deficient cells aim to move away from their point of origin (Figure 1B), leading to an even more higher travelled distance (Figure 1C; $p=0.007$).

We next performed invasion assays in a matrigel matrix, which revealed that *Sdhb* ^{-/-} cells are able to pass through a 8μm filter, digest matrigel matrix, and migrate beyond a 30μm arbitrary limit, classically used for such experiments (Figure 1D). Very few WT cells were able to get through the filter (even though the WT cells' size is inferior to that of *Sdhb* ^{-/-} cells), while about 25% of *Sdhb* ^{-/-} did (Figure 1E, $p=0.004$). Accordingly, we observed that about 60% of *Sdhb* ^{-/-} cells that had passed the filter (15% of all cells) were then able to migrate beyond the arbitrary 30μm limit, while none of the WT cells did (Figure 1F, $p<0.0001$). Interestingly, *Sdhb* ^{-/-} cells were found up to 180μm after the filter (from 45 to 180μm, data not shown), with a 90μm mean distance, compared to 20μm for WT cells (Figure 2G, $p<0.0001$), showing real skills to progress into the matrigel matrix.

The ability of passing through the filter, digesting extracellular matrix, coupled with high migration rates mimic the different steps that occur during the process of intravasation (or transendothelial migration). After this step, metastatic cells have to quit blood vessels through extravasation,

proliferate, and form micro-metastases. Hence, once in the circulation, cells have to develop adhesion abilities, which allow them to arrest and perform extravasation. We thus looked at cell adhesion, and observed that one hour after plating, about 87% of *Sdhb*^{-/-} cells are already adhesive, whereas in WT cells, adhesion is a rare event at such an early time point (Figures 1H and 1I; p=0,013). Three hours after plating, only about 20% of WT cells were adherent (Figure 1J).

Extravasation requires cells to roll and to adhere to endothelial cells, that both involve adhesion molecules such as integrins, galectins, focal adhesion kinases (FAK), selectins or mucins (Reymond et al., 2013). Interestingly, using our transcriptomic data, we observed that among these proteins *Cd24a*, *Muc1*, *Lgals9*, *Lgals3*, *Lgals3bp*, *Ptk2* and integrins $\alpha 1$, $\alpha 8$, $\alpha 11$, $\beta 3$ and $\beta 5$ mRNAs expression were upregulated in *Sdhb*^{-/-} cells as compared to WT cells (Supplemental Figure 1), suggesting that these proteins may be responsible for the high adhesive abilities described in *Sdhb*^{-/-} cells. Moreover transendothelial migration, which requires the loss of adherent junctions between endothelial cell (or their retraction) can be promoted by β -catenin and VEGF (Reymond et al., 2013). Actually we observed that both *Ctnnb1* and *Vegfa* were induced in *Sdhb* deficient cells (Supplemental Figure 1).

Altogether, these data established that *Sdhb*^{-/-} imCCs are an adequate *in vitro* model to decipher the molecular pathway responsible for *SDH*-related invasive capacities.

KRT19 is hypermethylated and downregulated in *Sdhb*^{-/-} imCC

One of the most significantly hypermethylated and downregulated gene in *SDH*-deficient PCC/PGL is the *KRT19* gene (Letouze et al., 2013). We thus chose to evaluate its functions in *Sdhb*^{-/-} imCC. First, we confirmed using Representative reduced bisulfite sequencing data generated on this cell line that *KRT19* hypermethylation did occur in the murine cell line, following *Sdhb* gene inactivation. We observed a 30% increase in DNA methylation at the *Krt19* locus as compared to WT cells (Figure 2B). This was associated with a marked decrease in gene expression evaluated by quantitative RT-PCR, which revealed a 10-fold decrease in *Krt19* mRNA expression as compared to controls (Figure 2C,

p=0.002) and by immunofluorescence which confirmed that the KRT19 protein was almost undetectable in *Sdhb* ^{-/-} cells (Figure 2D).

KRT19 rescue partially reversed *Sdhb* ^{-/-} cells metastatic hallmarks

To establish the participation of KRT19 to the metastatic phenotype of *Sdhb*-deficient cells, we infected cells with a lentivirus expressing KRT19 to re-introduce this function in *Sdhb* ^{-/-} cells. A GFP-expressing lentivirus was used as a control. KRT19 lentiviral infection induced a high up-regulation of *Krt19* mRNA level in all cell types (1000- fold induction, Figure 3A). Immunofluorescence analysis showed that the level of KRT19 protein in infected *Sdhb* ^{-/-} cells was similar to that observed in WT cells (infected with both KRT19 and GFP lentiviruses) (Figure 3B).

In *Sdhb* ^{-/-} cells, KRT19 rescue led to a significant, although not complete, inhibition of collective migration. Closure index, which is representative of the wound closure, significantly decreased from 60% to 48% (p=0.0002) while it had no effect on WT cells (26% in GFP-infected cells compared to 28% in KRT19-infected cells, p=0,34) (Figure 3C).

Single cell tracking experiment was performed to establish the impact of KRT19 re-introduction on individual cell speed. We observed that KRT19 rescue induced a significant (but also incomplete) reduction of *Sdhb* ^{-/-} imCC speed (from 16 μ m/h to 14 μ m/h, p=0.0013), while it had no effect on WT cells (12 μ m/h in both conditions, p=0.71) (Figure 3D). Surprisingly, vector diagram representation did not reveal any difference in cells directionality after protein rescue (Supplemental Figure 2A) and mean distance traveled stayed unchanged in *Sdhb* ^{-/-} cells after KRT19 rescue (Supplemental Figure 2B).

We next compared the invasive capacities of KRT19-infected and GFP-infected cells (Figure 3E). KRT19 rescue had no statistically significant effect on cells' abilities to get through the filter (28% of GFP-infected *Sdhb* ^{-/-} cells crossed through the filter vs 30% of KRT19-infected cells) (Figures 3E and 3F). KRT19 rescue did not significantly modify the proportion of invasive cells (10% of GFP-infected

cells vs 8% of KRT19-infected cells (Figure 3G) and had no impact on the traveled distance (Figure 3H).

Finally, we evaluated cell adhesion and found that KRT19 re-expression mildly reduced the adherence of *Sdhb*^{-/-} cells to 64% after 1h as compared to 78% with GFP infection (Figures 3I and 3J, $p=0.0013$). Furthermore, adhesion course analysis revealed that KRT19 rescue induced a stable inhibition of cell adhesion, which is maintained during all the time-laps studied, and not just delayed (Figure 3K).

Discussion

In the present study, we demonstrate that *Sdhb* inactivation alone is sufficient to promote the transformation of mouse chromaffin cells into metastatic-like cells. We show that *Sdhb* knock-out leads to the hypermethylation of *Krt19* gene that is responsible for the extinction of its expression. Finally, our data support the functional role of KRT19 in some of the phenotypic modifications observed in *Sdhb*-deficient cells. Altogether, these data establish that *Sdhb* does act as a tumor suppressor gene by promoting epithelial-to-mesenchymal transition and that KRT19 is one of the actors of this process.

We focused on phenotypico-morphological features of *Sdhb* ^{-/-} cells, by studying migratory, invasive and adhesive properties of these cells. To our knowledge, this is the first evaluation of such types of characteristics in an *Sdhb*-deficient context. We were thus able to highlight that *Sdhb* ^{-/-} cells display high migratory skills (collectively and individually), high invasive rates, and important adhesive properties, as compared to WT cells. Indeed we observed enhanced skills of *Sdhb* ^{-/-} cells to pass through a filter's pores and to invade a matrigel matrix, which could be assimilated to the different steps of transendothelial migration. We also showed increases in individual cell speed and mean travelled distance. Moreover adhesion studies suggest an increased ability of *Sdhb* ^{-/-} cells to perform extravasation. Altogether, these results show that *Sdhb* loss alone can be responsible for the induction of EMT-like hallmarks in chromaffin cells, characterized by a higher invasive and migratory phenotype. It is still unclear why SDHB inactivation is responsible for a metastatic phenotype in PCC/PGL patients, while mutations in other *SDHx* genes are not. Basically, two major hypotheses could explain this difference: i) the coexistence of another genetic or genomic alteration that would act in addition or in synergy with SDH inactivation; or ii) another, yet unidentified, function of the SDHB protein, that would mediate EMT in case of *SDHB* mutation. Our results in the *Sdhb* knock-out cell model are in favor of the second one and suggest that *SDHB* inactivation is sufficient to induce both PCC/PGL tumorigenesis and the EMT-associated metastatic skills.

We then focused on KRT19, which expression is lost in human *SDHB*-malignant tumors and in *Sdhb* ^{-/-} cells (through promoter's methylation). Intermediate filaments have been described to be implicated in cell migration and adhesion (Ju et al., 2013; Seltmann et al., 2013) as well as in cell invasion (Crowe et al., 1999; Ju et al., 2013). However, our *in vitro* results on KRT19 rescue in *Sdhb*-deficient cells show that KRT19 does not have a significant impact on invasion (despite a trend to a reduced ability to pass through the filter and of the percentage of invasive cells). Nevertheless, KRT19 rescue does reduce collective and individual migration, as well as adhesive abilities, which could suggest a global effect on metastatic skills. Altogether, this model of KRT19 rescue in *Sdhb* deficient cells does demonstrate an implication of this intermediate filament in the EMT phenotype, but also shows that KRT19 loss is only one the players of this process and definitely does not promote the whole phenotype observed.

KRT19 loss is a secondary phenomenon, and is the consequence of *KRT19*'s promoter hypermethylation. Indeed both in human tumors and in this cellular model, *SDHB* loss is responsible for succinate dehydrogenase inactivation, succinate accumulation, and then inhibition of 2-oxoglutarate dependent dioxygenases (Letouze et al., 2013; Xiao et al., 2012). Of the dioxygenases described to date, TETs enzymes are responsible for DNA demethylation, and are inhibited in *Sdhb* ^{-/-} cells, leading to global hypermethylation of genes, including *KRT19*. By being one of the most significantly hypermethylated, and one of the most significantly down-regulated gene, *KRT19* was a pertinent candidate to decipher the still misunderstood link between *SDHB* deficiency, EMT and malignancy. This work, by identifying KRT19 as an actor implicated in migratory and adhesive properties of *Sdhb* ^{-/-} cells, did not lead to the identification of the major actor (if one exists) implicated in *Sdhb* associated metastatic phenotype. However as it did not allow to explain the whole phenotype, it clearly suggests that among KRT19, other EMT players are implicated in the establishment of the metastatic skills that we observed, and it would be really interesting to study some other judiciously chosen targets, to study theirs implications in the features we observed in the basal model and theirs possible interactions with KRT19 (to study eventual synergic effects).

Altogether these experiments allow the opening of a new field of interest concerning PCC and PGL malignancy and especially *SDHB*-related malignancy. Indeed this study further validated that *SDHB* loss induces an EMT-like phenomenon in cells, responsible for metastatic abilities and thus for the bad prognosis associated with *SDHB* mutations in patients. Moreover, although we described KRT19 as implicated in the establishment of the mesenchymal phenotype, our results also clearly suggest that other partners are implicated in the EMT that drives PCC/PGL malignancy.

Experimental procedures

Cell culture

Immortalized mouse chromaffin cells (imCCs) were cultured in DMEM (Dubecco Modified Eagle Medium, Gibco) with 4,5% FBS (Foetal bovine serum, Gibco) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin, Gibco). Cells were grown at 37°C, in 5% CO₂.

Quantitative Real-Time (qRT)-PCR

Total RNA were extracted from cell pellets using RNA Extract II kit® (Macherey-Nagel), as described by the manufacturer. 3 µg of RNA were treated with DNase Amp Grade and EDTA (Invitrogen) during 10min at 65°C. Reverse transcription was performed on 1.5 µg of RNA, using random primers and SuperScript Reverse transcriptase (Invitrogen), during 1h at 42 °C. RNA concentrations were determined with a NanoVue Plus (GE Healthcare ®) and subjected to qRT-PCR in triplicate, using PTC-200 DNA Engine® Thermal Cycler. Normalization was performed with Ubc and 18S amplifications, and comparisons were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. Primers' sequences used for qRT-PCR are detailed in Supplemental table 1.

Immunofluorescence assay

For immunofluorescence assays, cells plated on glass slides were washed in PBS and fixed for 10min in ice-cold paraformaldehyde 4%. Antigen retrieval was performed with Tris-EDTA buffer (1 mM EDTA, 0.005% Tween 20, pH=9) during 45 seconds in a microwave. After blockade of aspecific sites (1% BSA, 0.1% Triton), primary antibody (KRT19, Thermo RB9021, 1/100) was incubated for 90min at room temperature. Secondary antibodies, conjugated with Alexa fluor 594 (1/2000, Invitrogen), were incubated for 1h, at room temperature in the dark. Slides were finally mounted in Vectashield, containing DAPI, for a blue nuclear staining. Acquisitions were performed using Axioimager Z1 Zeiss, with apotome system.

Transcriptome cellules

Methylome analysis

KRT19 methylation data was a part of global DNA methylation study performed on imCC using Reduced Representation Bisulphite Sequencing technique (RRBS), as previously described (Letouze et al., 2013)

Wound scratch assay

Cells were seeded at confluence in 6-well dishes. Twenty-four hours after plating, a wound was made using a 10µL tip and cells were allowed to migrate for 10h. Relative cell migration was established by calculating the closure index, based on the analysis of at least 25 pictures for each time point and condition, using ImageJ software, as described (Letouze et al., 2013). The experiments were performed in triplicates.

Single cell tracking

Exponentially growing cells were seeded at a density of 5×10^4 in a six-well plate. After 24h of incubation, the cells were imaged every 4min for 12h. The nucleus of each cell was manually tracked with the Manual Tracking plugin for ImageJ. Experiments were performed three times, with at least 25 cells tracked each time.

Invasion assay

A matrigel matrix was previously polymerized in a transwell system (BD Biosciences); 5×10^4 cells were seeded on in complete medium and left to adhere for 4h. After 3 washes in medium without FBS, cells were allowed to invade the matrix during 5 days, at 37 °C, with 5% CO₂. Medium with FBS was added on top of the matrigel matrix. After 1h of calcein staining, living cells were followed using

confocal microscopy. For each experiment, each sample was performed in duplicate and 3 areas of the Transwell were studied. Experiments were performed three times.

Adhesion assay

After complete detachment from their plate using trypsin-EDTA 0,05% (Gibco), 5×10^4 cells were plated in 6-wells dishes. Cell adhesion was followed by taking picture during 3h. Comparisons were performed by counting adherent *versus* non-adherent cells (rounded and refractive cells). Experiments were performed three times.

Plasmid construction

GFP (Green Fluorescent Protein) and KRT19 (Keratin19) cDNA have been inserted in a lentiviral shuttle plasmid by Gateway recombination (Life Technologies, Saint-Aubin, France) under the transcriptional control of the PGK (Phospho-Glycerate Kinase) promoter. The recombinant lentiviral genome contained a self-inactivating deletion of the left LTR and the central polypurine tract/central termination sequence (cPPT/CTS) and was previously described (Bemelmans et al., 2005).

Virus production and cell transduction

Recombinant lentiviral particles were produced by transient transfection of HEK-293T cells as previously described (Bemelmans et al., 2005). Viral supernatants were concentrated by ultracentrifugation at 70,000 g for 90 min at 4 °C. Finally, to achieve a 1,000-fold concentration of the initial supernatant, viral pellets were resuspended in a minimal volume of PBS. Aliquots of 5–10 μ l were then stored at –80 °C until further use. Total particle concentration of the viral stocks was estimated by quantification of the p24 capsid protein using RETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISA kit (ZeptoMetrix, Buffalo, New York, United States) according to the manufacturer's instructions. For transduction of 5×10^4 cells, a multiplicity of infection (MOI) of 100 ng of p24 protein/cell was used.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Prism software. Data are represented as mean (of at least 3 independent experiments) \pm SEM (standard error of the mean).

Author contributions

CL designed and performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

MD performed experiments and wrote the corresponding experimental procedures section.

AB performed experiments and wrote the corresponding experimental procedures section

MM performed experiments.

EL participated to transcriptome and RRBS analyses.

AB & LL discussed the results and commented the manuscript.

APGR & JF conceived and supervised the project, discussed the results and the analysis, commented and wrote the manuscript at all stages.

Acknowledgements

This work was supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique grant COMETE 3 (AOM 06 179) and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR 08 GENOPATH 029 MitOxy and ANR-2011- JCJC-00701 MODEOMAPP). This work has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement number 259735.

This project was realized with the support of “ La Fondation ARC ” (DOC20130606831).

Conflicts of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

- Amar, L., Baudin, E., Burnichon, N., Peyrard, S., Silvera, S., Bertherat, J., Bertagna, X., Schlumberger, M., Jeunemaitre, X., Gimenez-Roqueplo, A.P., *et al.* (2007). Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 3822-3828.
- Androulakis, N., Agelaki, S., Perraki, M., Apostolaki, S., Bozionelou, V., Pallis, A., Kalbakis, K., Xyrafas, A., Mavroudis, D., and Georgoulas, V. (2012). Clinical relevance of circulating CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer. *British journal of cancer* 106, 1917-1925.
- Astuti, D., Latif, F., Dallol, A., Dahia, P.L., Douglas, F., George, E., Skoldberg, F., Husebye, E.S., Eng, C., and Maher, E.R. (2001). Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *American journal of human genetics* 69, 49-54.
- Baysal, B.E., Ferrell, R.E., Willett-Brozick, J.E., Lawrence, E.C., Myssiorek, D., Bosch, A., van der Mey, A., Taschner, P.E., Rubinstein, W.S., Myers, E.N., *et al.* (2000). Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science (New York, NY)* 287, 848-851.
- Bemelmans, A.P., Bonnel, S., Houhou, L., Dufour, N., Nandrot, E., Helmlinger, D., Sarkis, C., Abitbol, M., and Mallet, J. (2005). Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon subretinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter. *The journal of gene medicine* 7, 1367-1374.
- Briere, J.J., Favier, J., Benit, P., El Ghouzzi, V., Lorenzato, A., Rabier, D., Di Renzo, M.F., Gimenez-Roqueplo, A.P., and Rustin, P. (2005). Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1alpha nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Human molecular genetics* 14, 3263-3269.
- Burnichon, N., Briere, J.J., Libe, R., Vescovo, L., Riviere, J., Tissier, F., Jouanno, E., Jeunemaitre, X., Benit, P., Tzagoloff, A., *et al.* (2010). SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Human molecular genetics* 19, 3011-3020.
- Burnichon, N., Buffet, A., Parfait, B., Letouze, E., Laurendeau, I., Lorient, C., Pasmant, E., Abermil, N., Valeyrie-Allanore, L., Bertherat, J., *et al.* (2012a). Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma. *Human molecular genetics* 21, 5397-5405.
- Burnichon, N., Cascon, A., Schiavi, F., Morales, N.P., Comino-Mendez, I., Abermil, N., Inglada-Perez, L., de Cubas, A.A., Amar, L., Barontini, M., *et al.* (2012b). MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res* 18, 2828-2837.
- Burnichon, N., Vescovo, L., Amar, L., Libe, R., de Reynies, A., Venisse, A., Jouanno, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Bertherat, J., *et al.* (2011). Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Human molecular genetics* 20, 3974-3985.
- Caren, H., Djos, A., Nethander, M., Sjoberg, R.M., Kogner, P., Enstrom, C., Nilsson, S., and Martinsson, T. (2011). Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma. *BMC cancer* 11, 66.
- Comino-Mendez, I., Gracia-Aznarez, F.J., Schiavi, F., Landa, I., Leandro-Garcia, L.J., Leton, R., Honrado, E., Ramos-Medina, R., Caronia, D., Pita, G., *et al.* (2011). Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nature genetics* 43, 663-667.
- Crona, J., Delgado Verdugo, A., Maharjan, R., Stalberg, P., Granberg, D., Hellman, P., and Bjorklund, P. (2013). Somatic mutations in H-RAS in sporadic pheochromocytoma and paraganglioma identified by exome sequencing. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98, E1266-1271.
- Crowe, D.L., Milo, G.E., and Shuler, C.F. (1999). Keratin 19 downregulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential. *Journal of dental research* 78, 1256-1263.
- Gimenez-Roqueplo, A.P., Favier, J., Rustin, P., Rieubland, C., Crespin, M., Nau, V., Khau Van Kien, P., Corvol, P., Plouin, P.F., and Jeunemaitre, X. (2003). Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer research* 63, 5615-5621.

Hao, H.X., Khalimonchuk, O., Schraders, M., Dephoure, N., Bayley, J.P., Kunst, H., Devilee, P., Cremers, C.W., Schiffman, J.D., Bentz, B.G., *et al.* (2009). SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science (New York, NY)* **325**, 1139-1142.

Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Chu, Y.W., Trevor, K.T., and Seftor, R.E. (1996). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer metastasis reviews* **15**, 507-525.

Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **110**, 341-350.

Ju, J.H., Yang, W., Lee, K.M., Oh, S., Nam, K., Shim, S., Shin, S.Y., Gye, M.C., Chu, I.S., and Shin, I. (2013). Regulation of cell proliferation and migration by keratin19-induced nuclear import of early growth response-1 in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **19**, 4335-4346.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1420-1428.

Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., *et al.* (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (New York, NY)* **260**, 1317-1320.

Letouze, E., Martinelli, C., Lorient, C., Burnichon, N., Abermil, N., Ottolenghi, C., Janin, M., Menara, M., Nguyen, A.T., Benit, P., *et al.* (2013). SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer cell* **23**, 739-752.

Lorient, C., Burnichon, N., Gadessaud, N., Vescovo, L., Amar, L., Libe, R., Bertherat, J., Plouin, P.F., Jeunemaitre, X., Gimenez-Roqueplo, A.P., *et al.* (2012). Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **97**, E954-962.

Morris, M.R., Gentle, D., Abdulrahman, M., Clarke, N., Brown, M., Kishida, T., Yao, M., Teh, B.T., Latif, F., and Maher, E.R. (2008). Functional epigenomics approach to identify methylated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *British journal of cancer* **98**, 496-501.

Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L., *et al.* (1993). Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* **363**, 458-460.

Navarro, A., Yin, P., Monsivais, D., Lin, S.M., Du, P., Wei, J.J., and Bulun, S.E. (2012). Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma. *PloS one* **7**, e33284.

Niemann, S., and Muller, U. (2000). Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nature genetics* **26**, 268-270.

Nozato, M., Kaneko, S., Nakagawara, A., and Komuro, H. (2013). Epithelial-mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma. *International journal of oncology* **42**, 134-140.

Omary, M.B., Coulombe, P.A., and McLean, W.H. (2004). Intermediate filament proteins and their associated diseases. *The New England journal of medicine* **351**, 2087-2100.

Paiva, F., Duarte-Pereira, S., Costa, V.L., Ramalho-Carvalho, J., Patricio, P., Ribeiro, F.R., Lobo, F., Oliveira, J., Jeronimo, C., and Henrique, R. (2011). Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms. *DNA and cell biology* **30**, 85-90.

Qin, Y., Yao, L., King, E.E., Buddavarapu, K., Lenci, R.E., Chocron, E.S., Lechleiter, J.D., Sass, M., Aronin, N., Schiavi, F., *et al.* (2010). Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nature genetics* **42**, 229-233.

Reymond, N., d'Agua, B.B., and Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature reviews* **13**, 858-870.

Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A., Rogers, M.A., *et al.* (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of cell biology* **174**, 169-174.

Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., and Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer cell* 7, 77-85.

Seltmann, K., Roth, W., Kroger, C., Loschke, F., Lederer, M., Huttelmaier, S., and Magin, T.M. (2013). Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *The Journal of investigative dermatology* 133, 181-190.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews* 2, 442-454.

Tripathi, M.K., Misra, S., and Chaudhuri, G. (2005). Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells. *Biochemical and biophysical research communications* 329, 508-515.

Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A.L., *et al.* (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science (New York, NY)* 249, 181-186.

Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., *et al.* (2012). Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & development* 26, 1326-1338.

Zhuang, Z., Yang, C., Lorenzo, F., Merino, M., Fojo, T., Kebebew, E., Popovic, V., Stratakis, C.A., Prchal, J.T., and Pacak, K. (2012). Somatic HIF2A gain-of-function mutations in paraganglioma with polycythemia. *The New England journal of medicine* 367, 922-930.

Figure Legends

Figure 1: Characterization of changes in migratory and invasive properties following *Sdhb* loss

- (A) Individual cells speed was estimated by tracking cell nucleus during 12 hours. Data are represented as mean \pm SEM. *** $p=0.0003$.
- (B) Vector diagrams representing directionality (left panel), and mean distance (middle and right panel).
- (C) Comparison of mean distance. Data are represented as mean \pm SEM. *** $p=0.0007$
- (D) Cells invasion's abilities were evaluated through their capacity to move into a matrigel matrix. Red line symbolized the filter.
- (E) Quantification of cell abilities to pass through the filter. Data are represented as mean \pm SEM. *** $p=0.0004$.
- (F) Quantification of cell invasion, cells were considered invasive beyond 30 μm . Data are represented as mean \pm SEM. **** $p<0.0001$.
- (G) Mean distance traveled by cells into matrigel matrix Data are represented as mean \pm SEM. **** $p<0.0001$.
- (H) Cell adhesion abilities were measured by counting adherent versus non-adherent cells one hour after plating. Scale bar 125 μm
- (I) Quantification of cell adhesion. Data are represented as mean \pm SEM. ** $p=0.013$.
- (J) Adhesion course: quantification of cell adhesion during 210 minutes.
- (K) Color code used for all figures

Figure 2: KRT19 loss of expression is driven by hyperméthylation

- (A) CpG island localization on *Krt19* gene.
- (B) Differential methylation rate of *Krt19* promoter in *Sdhb* deficient cells compared to WT cells.

(C) RTqPCR analyses showing *Krt19* underexpression in *Sdhb* deficient cells compared to WT cells.

Data are represented as mean \pm SEM, *** $p=0.002$.

(D) KRT19 was studied using immunofluorescence and specific antibody. Scale bar 20 μm .

Figure 3: KRT19 rescue after lentiviral infection and its functional consequences

(A) KRT19 infection validation was performed at mRNA level using RTqPCR. Cells were independently infected with the same lentiviral particles encoding GFP, as a control. Data are represented as mean \pm SEM. **** $p<0.0001$; ns: non-significant

(B) KRT19 rescue was confirmed in *Sdhb* $-/-$ cells at protein level using immunofluorescence. As a control. Cells were independently infected with the same lentiviral particles encoding GFP did not express KRT19. Scale bar 20 μm

(C) Collective migration was followed using a wound scratch assay. Cells were studied for migration during 10 hours. Migration is represented as the closure percentage of the wound. Data are represented as mean \pm SEM. *** $p=0.0002$; ns, non significant. Scale bar 250 μm

(D) Individual cells speed was estimated by tracking cell nucleus during 12 hours. Data are represented as mean \pm SEM. ** $p=0.0013$; ns, non-significant.

(E) Involvement of KRT19 in cell invasion was assessed through invasion assay in a matrigel matrix. Red line symbolized the filter.

(F) Quantification of cell abilities to pass through the filter. Data are represented as mean \pm SEM. ns, non-significant.

(G) Quantification of cell invasion, cells were considered invasive beyond 30 μm . Data are represented as mean \pm SEM. ns, non-significant.

(H) Mean distance traveled by cells into matrigel matrix. Data are represented as mean \pm SEM. ns, non-significant.

(I) Cell adhesion abilities were measured by counting adherent versus non-adherent cells one hour after plating. Scale bar 125 μm

(J) Quantification of cell adhesion. Data are represented as mean \pm SEM. ** $p=0.0013$; ns, non-significant.

(K) Adhesion course: quantification of cell adhesion during 210 minutes.

(L) Color code used for all figures

Table

Gene	Primer sequence			
<i>Ubc</i>	5'	AGCCCAGTGTTACCACCAAG	3'	5' ACCCAAGAACAAGCACAAG 3'
<i>18S</i>	5'	CGCGGTTCTATTTTGTGTTGGT	3'	5' AACCATAAACGATGCCGAC 3'
<i>Sdhb</i>	5'	CAAGGATCTAGTCCCTGATTGA	3'	5' TATCTGCAGTCCATCGAGGA 3'
<i>Krt19</i>	5'	GGTGCCACCATTGACAACCTC	3'	5' GAGACAGAACACGCCTTGC 3'
<i>Supplemental table 2: Sequences of primers used for RTqPCR analyses</i>				

Figure 1

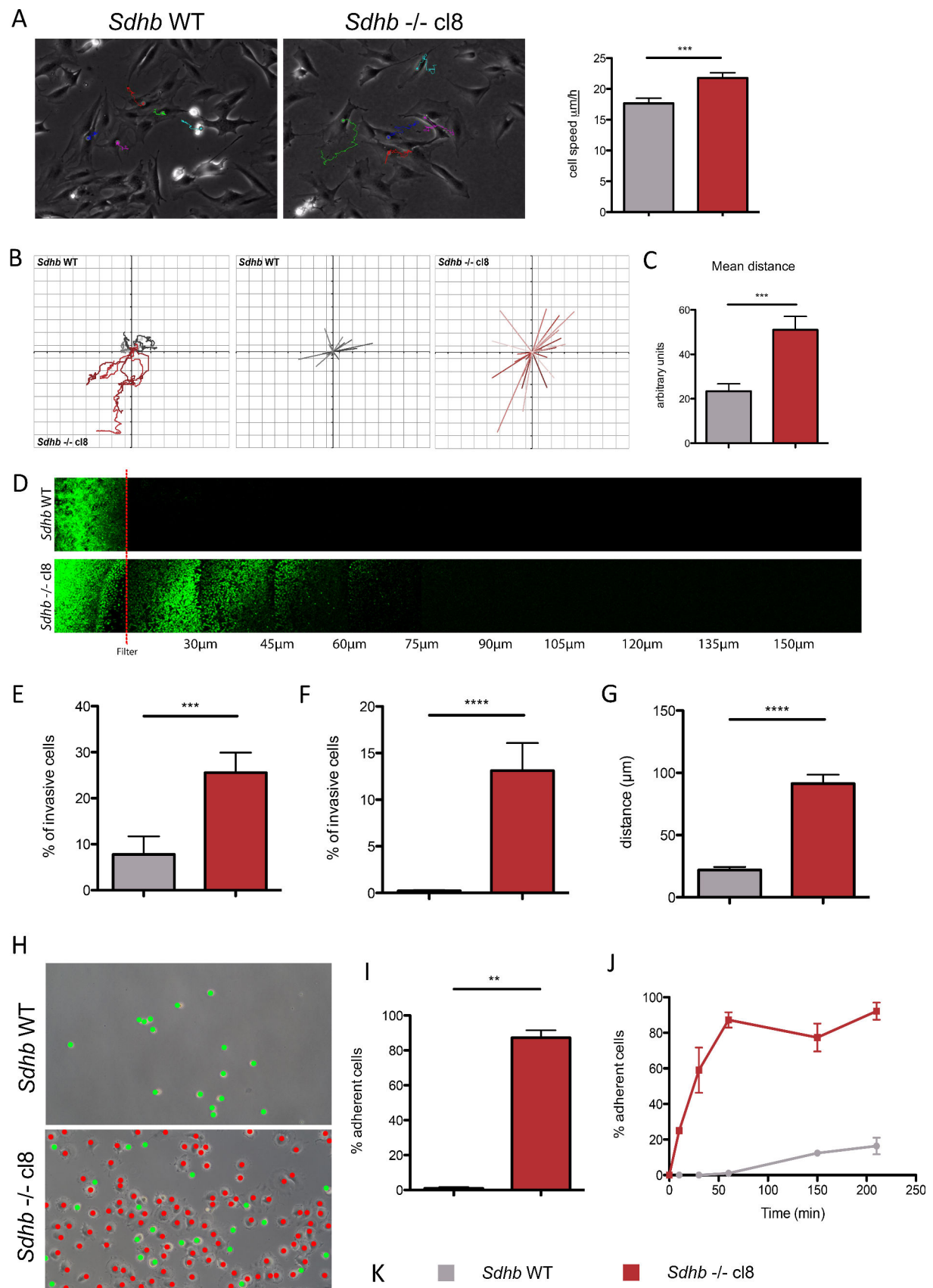


Figure 2

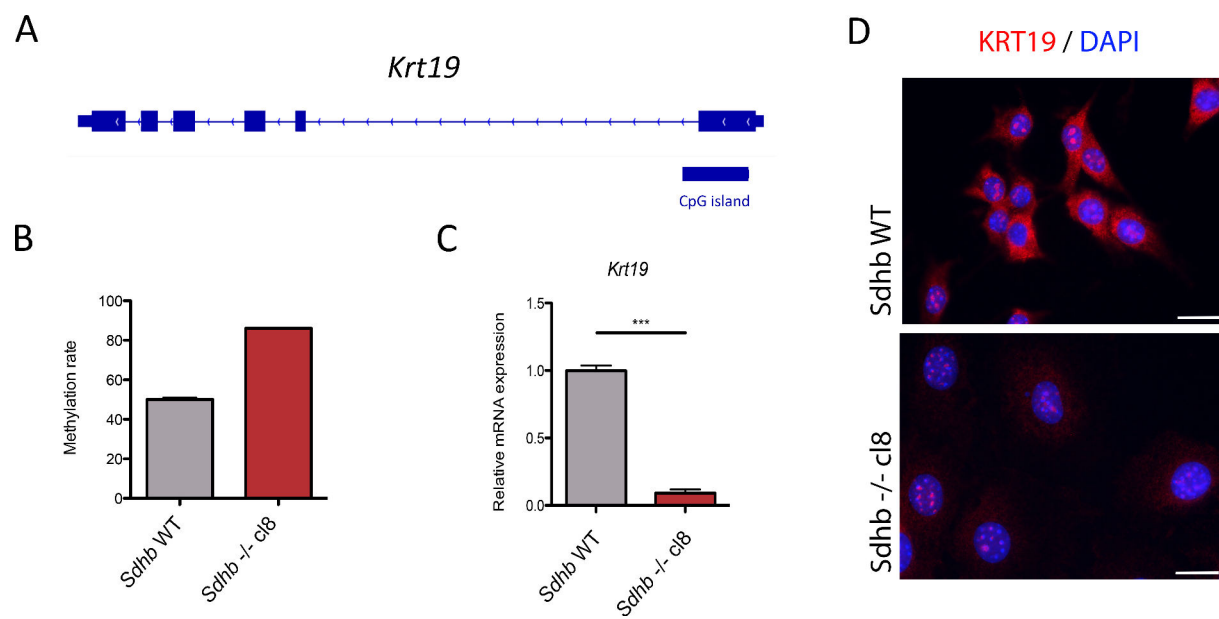
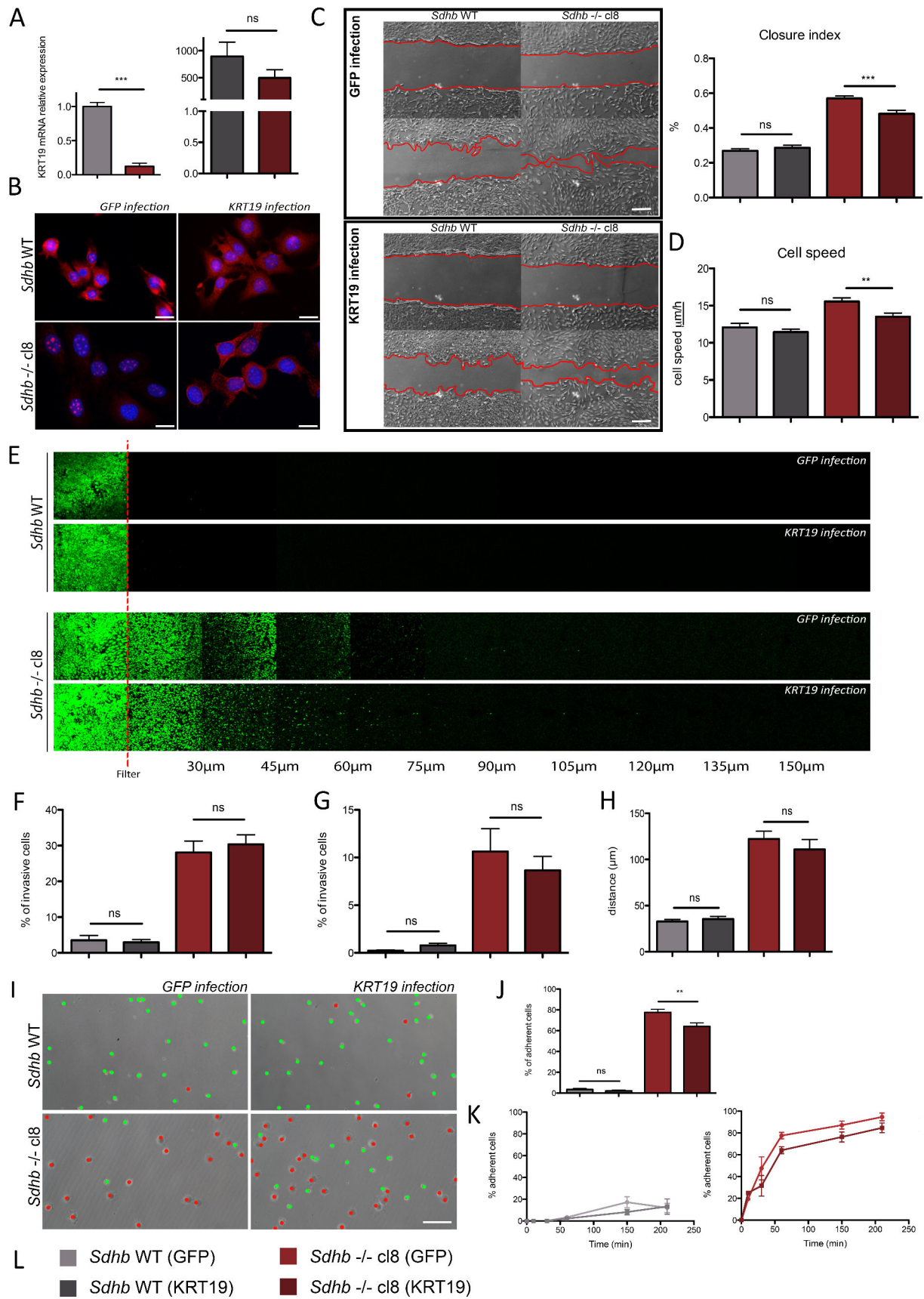


Figure 3



Supplemental Figure 1: referred to Figure 1

Transcriptomic data correlated with high adhesive skills observed in *Sdhb*^{-/-} cells.

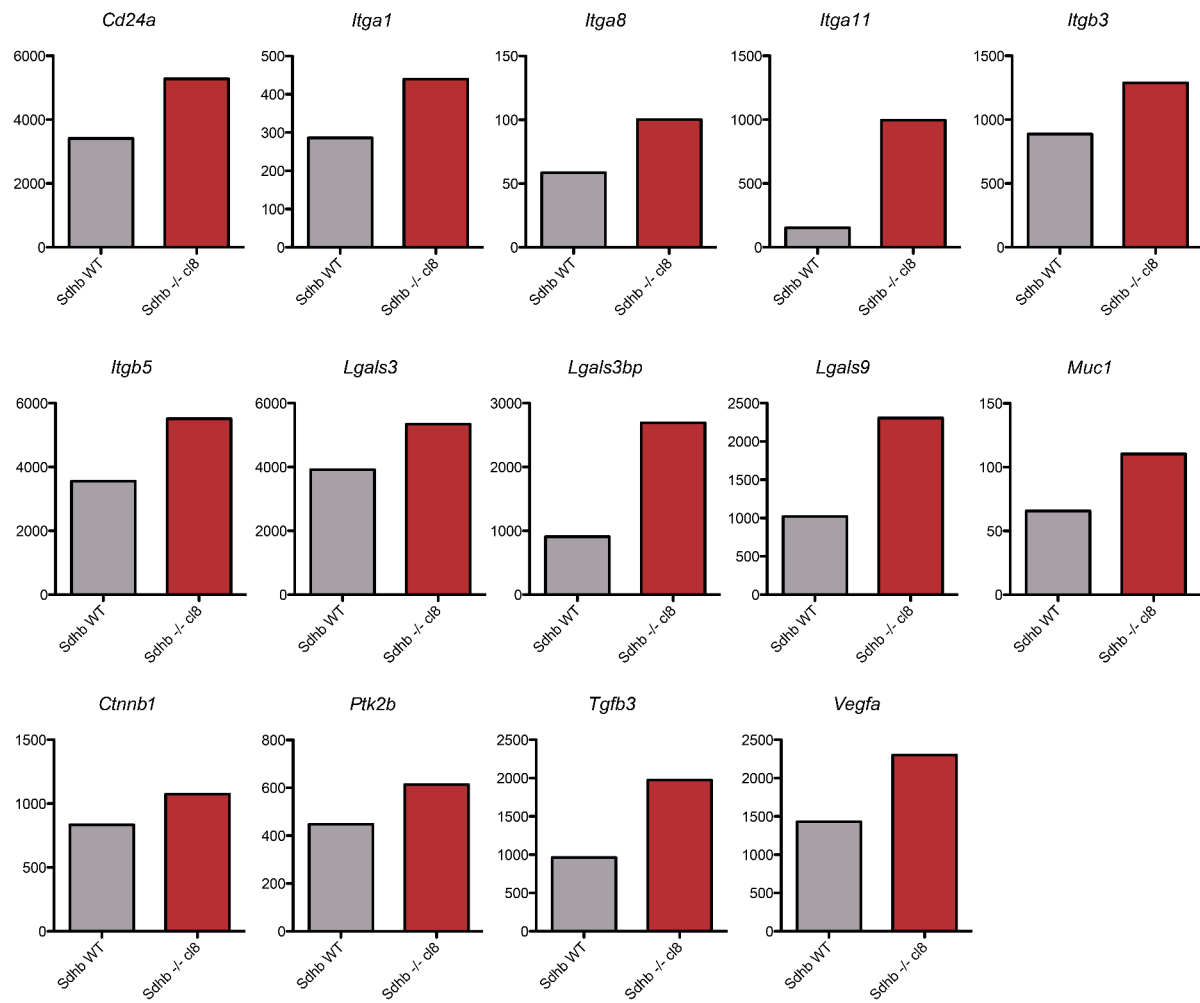
Supplemental Figure 2: referred to Figure 3

(A) Total distance traveled in 12 hours. Data are represented as mean \pm SEM.

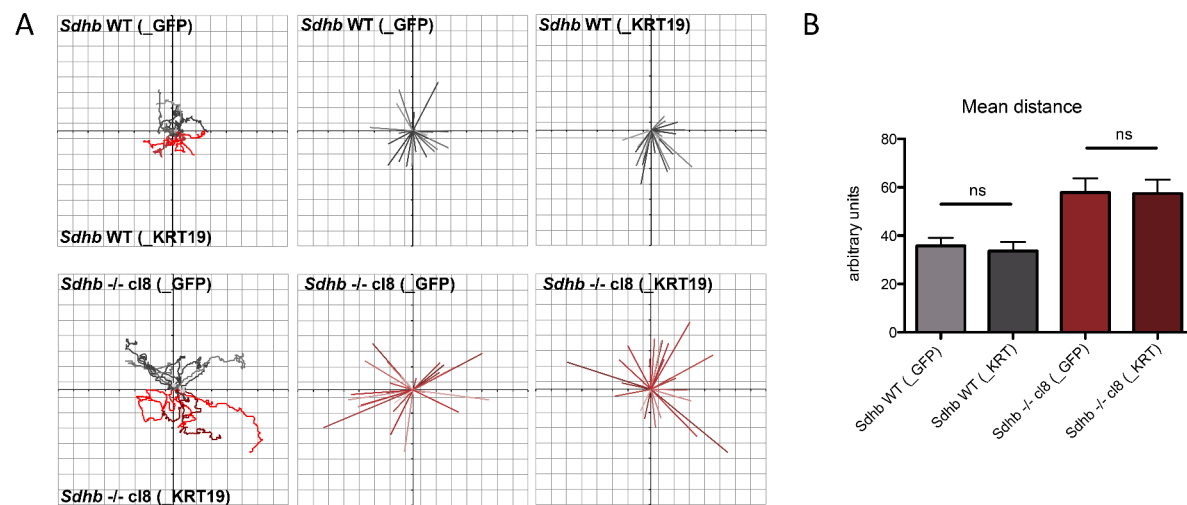
(B) Vector diagrams representing directionality (upper panels), and mean distance (lower panels).

(C) Comparison of mean distance. Data are represented as mean \pm SEM.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



3. Discussion et perspectives

Les objectifs de ce travail étaient triples : nous souhaitions évaluer et valider le modèle cellulaire d'imCC *Sdhb*^{-/-} pour l'étude de l'EMT dans un contexte *Sdhb*-dépendant ; décrire les propriétés fonctionnelles des cellules *Sdhb*^{-/-} permettant d'expliquer le phénotype métastatique des tumeurs *SDHB*-mutées ; et enfin définir plus précisément le rôle du gène *KRT19*.

Malgré quelques divergences de modulation d'expression de gènes au sein de familles de gènes, entre les tumeurs humaines et le modèle cellulaire murin, la caractérisation moléculaire (transcriptionnelle et protéique) des cellules nous a permis de valider l'utilisation de notre modèle pour étudier l'EMT *Sdhb*-dépendante. Par exemple nous n'avons pas retrouvé l'induction de *Lox12* dans les cellules *Sdhb*^{-/-}, mais observé une induction du gène *Lox*. De même *SNAI1*, dont l'expression était inchangée dans les tumeurs humaines, est à la fois induit transcriptionnellement et transloqué au noyau dans notre modèle cellulaire. Ceci suggère des différences de régulation d'une même voie moléculaire, dans deux modèles d'étude distincts, mais conforte l'idée d'une EMT *Sdhb*-dépendante, responsable de la malignité.

Cette étude décrit pour la première fois les conséquences fonctionnelles de la perte de la protéine *SDHB* dans des cellules, et met en évidence des caractéristiques reflétant une EMT, comme l'augmentation de la migration (collective et individuelle), de l'invasion et de l'adhésion. Ces étapes correspondent aux différentes étapes menant à la dissémination métastatique.

La kératine 19 est une protéine de la famille des filaments intermédiaires, décrites pour son implication dans les phénomènes de migration et d'adhésion, comme nous avons pu le montrer dans cette étude. En revanche nous n'avons pas pu mettre en évidence de rôle significatif de cette protéine dans l'invasion des cellules. Malgré tout, étant donné son implication dans les autres étapes du processus, il est possible d'envisager un possible effet global de *KRT19* dans un modèle reconstitué *in vivo*. Il est en effet envisageable que la diminution de la migration individuelle et collective ainsi que de l'adhésion aient un impact sur l'invasion des cellules.

Cependant, en absence de retour à l'état de base après réintroduction de *KRT19*, nous n'avons pas pu conclure à un effet important de cette protéine. Ce gène, l'un des plus hyperméthylés et des plus sous-exprimés était un très bon candidat pour l'étude de l'EMT dans les cellules *Sdhb*^{-/-}. Il s'est cependant révélé ne pas jouer un rôle majeur permettant d'expliquer à lui seul le phénotype cellulaire observé, suggérant ainsi l'implication d'autres facteurs.

La perte de l'expression de *KRT19* est un événement secondaire à la méthylation de son promoteur, consécutive à l'inhibition des enzymes responsables de la déméthylation de l'ADN et des histones par le succinate. L'accumulation de cet oncométabolite semble avoir des conséquences multiples, qui convergent vers un changement global des interactions des cellules tumorales entre elles, et avec leur microenvironnement. Il serait ainsi très intéressant de poursuivre cette étude par une analyse des autres voies possiblement modulées par l'accumulation du succinate, afin de déterminer tous les intervenants impliqués dans la régulation de l'EMT *Sdhb*-dépendante.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. LA TRANSITION NEUROENDOCRINO-MÉSENCHYMATEUSE (neuroendoMT)

L'ensemble de mon travail de thèse m'a permis d'établir un lien entre la malignité *SDHB*-dépendante et la transition épithélio-mésenchymateuse dans les PCC/PGL. Dans les échantillons tumoraux, j'ai montré une induction transcriptionnelle de cette voie, accompagnée d'une rétention nucléaire de SNAIL dans les tumeurs *SDHB*-malignes. Dans un modèle de cellules chromaffines murines porteuses d'une inactivation complète du gène *Sdhb*, j'ai décrit des caractéristiques migratoires, adhésives et invasives des cellules *Sdhb*^{-/-} comparativement aux cellules WT. L'appellation de ce phénomène en tant qu'EMT est discutable dans le contexte particulier des PCC/PGL, étant donné la nature non-épithéliale des cellules chromaffines, et notamment étant donné que mes résultats ne m'ont pas permis de mettre en évidence de diminution de la E-cadhérine, comme cela est largement décrit dans les cellules des tumeurs épithéliales après un phénomène d'EMT. Cependant j'ai pu observer la rétention nucléaire de SNAIL dans les tumeurs *SDHB*-malignes ainsi que dans les cellules chromaffines après inactivation du gène *Sdhb*, ce qui constitue un événement largement en faveur d'une induction de l'EMT *via* l'activation de l'un de ces régulateurs majeurs. S'il est incorrect de parler d'EMT au sens strict, je pense qu'il est malgré tout clair qu'il se produit, consécutivement à la perte de la protéine SDHB dans les cellules chromaffines, un phénomène très similaire à l'EMT, qui pourrait plus justement être nommé « transition neuroendocrino-mésenchymateuse ». Ce terme ferait ainsi référence à la nature non-épithéliale des cellules initiales, comme cela a été fait pour parler de la transition endothélio-mésenchymateuse, au cours de la fibrose tissulaire notamment [271, 281]. En effet dans ces cellules endothéliales, la perte de la E-cadhérine ne constitue pas le marqueur fondamental de cette transition puisqu'elle n'est pas exprimée. En revanche, c'est la VE-cadhérine, impliquée dans la formation des jonctions adhérentes des cellules endothéliales qui est perdue. Ce phénomène, très récemment décrit est encore peu connu, mais est en totale adéquation avec mes résultats, puisque j'ai observé, dans des cellules neuroendocrines, une diminution de la N-cadhérine (et des jonctions adhérentes entre cellules résultantes), consécutivement à la perte de la protéine SDHB, elle-même responsable de la rétention nucléaire de SNAIL. Ceci est donc parfaitement en accord avec l'induction SNAIL-dépendante d'un phénomène équivalent à l'EMT : la transition neuroendocrino-mésenchymateuse (neuroendoMT).

II. LE PHÉNOTYPE « SUPER-HYPERMÉTHYLATEUR » DES TUMEURS SDHB-MUTÉES

L'analyse des données de méthylation de l'ADN des PCC/PGL de notre cohorte a mis en évidence l'importance de la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes dans ces tumeurs. En effet, nous avons pu montrer une très forte corrélation entre les niveaux d'expression des gènes (données de transcriptome) et leur niveau de méthylation (données de méthylome). Le phénotype hyperméthylateur des tumeurs *SDHx*, révélé par cette étude, nous a permis mettre à jour le rôle d'oncométabolite du succinate, responsable de l'inactivation compétitive d'enzymes dépendantes de l' α -KG, comme les TETs et les KDMs, et de comprendre la répression génique de marqueurs importants. Ainsi l'absence d'expression de *PNMT* permet d'expliquer l'absence de sécrétion de

noradrénaline par ces tumeurs, tandis que la perte d'expression de MGMT permet de prédire la réponse au traitement par le témozolomide, qui est plus efficace dans ces tumeurs où les réparations des cassures de l'ADN (induite par la drogue) ne seront pas optimales du fait de l'inactivation de cette enzyme. Ces données ouvrent donc de multiples perspectives pour mieux appréhender la tumorigenèse des PCC/PGL et notamment de la tumorigenèse *SDHB*-dépendante. En effet, nous avons pu constater de manière particulièrement intéressante, qu'au-delà du phénotype hyperméthylateur commun à toutes les tumeurs porteuses de mutation sur l'un des gènes *SDHx* (puisqu'elles présentent toute une accumulation de succinate), les tumeurs porteuses de mutation sur le gène *SDHB* présentaient une hyperméthylation encore plus importante, une « super-hyperméthylation », associée à une répression génique plus forte. Etant donné que parmi les gènes hyperméthylés (et sous exprimés) on retrouve des gènes impliqués dans le processus d'EMT, cette différence de méthylation observée dans les tumeurs *SDHB*-mutées pourrait être une explication, ou une conséquence de cette induction de l'EMT.

III. **KRT19, UN CANDIDAT IDÉAL**

Parmi les gènes associés au processus d'EMT, le gène *KRT19* était l'un des plus hyperméthylés et des plus sous-exprimés, à la fois dans les tumeurs *SDHB*-mutées et dans les cellules *Sdhb*^{-/-}. Il constituait donc le gène candidat idéal pour étudier les conséquences de la perte d'expression secondaire à l'hyperméthylation d'un gène associé à l'EMT. Bien que j'aie pu montrer l'implication de la kératine 19 dans les processus d'adhésion, de migration et d'invasion des cellules, je n'ai pas pu expliquer l'intégralité du phénotype par la modulation de l'expression de ce gène. Ceci suggère donc que très logiquement, l'induction de l'EMT dans les cellules chromaffines *Sdhb*^{-/-} ne passe pas uniquement par une dérégulation de la kératine 19, mais que d'autres acteurs sont également impliqués.

Les analyses bio-informatiques ne m'ont pas permis de mettre en évidence d'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation des jonctions cellulaires, à part *KRT19* et *CDH2* (codant pour la N-cadhérine, mais dont la variation dans l'expression est beaucoup moins drastique que celle observée pour *KRT19*). Il me semble donc logique de poursuivre cette étude, pour laquelle il n'y a pas d'autre candidat évident concernant les jonctions intercellulaires, par une étude du microenvironnement tumoral. En effet, une fois qu'elles ont acquis toutes les modifications nécessaires à leur individualisation, et à leur migration, les cellules évoluent dans une matrice remodelée qu'elles sont par ailleurs capables de dégrader.

Parmi les enzymes inhibées par le succinate, on retrouve les prolyl hydroxylases du collagène (CPH), dont le rôle est d'assurer la maturation des fibres de collagènes, afin de constituer une MEC stable, normalement non propice à la migration cellulaire. Ceci suggère que le succinate aurait également un rôle à jouer dans la modulation de la MEC. Il serait alors très intéressant d'étudier les conséquences de l'inactivation du gène *Sdhb* sur l'évolution de cette matrice, mais aussi le rôle de cette dernière dans la modulation des propriétés migratoires, invasives et adhésives des cellules. Ce projet a d'ores et déjà démarré au laboratoire, puisqu'il s'agit du sujet de thèse d'une étudiante (Mélania Menara).

IV. LE RÔLE ESSENTIEL DE SNAIL DANS LES PCC/PGL *SDHB*-DÉPENDANTS

Mes travaux m'ont conduit à démontrer une accumulation de ce facteur de transcription dans les noyaux des cellules dans un contexte d'inactivation du gène *SDHB*, couplée à un phénomène d'hyperméthylation plus important dans ce même contexte. Ces résultats suggèrent que l'induction de SNAIL, spécifique des cellules présentant une inactivation du gène *SDHB*, pourrait avoir un rôle dans l'établissement du phénotype « super-hyperméthylateur » observé. De plus, SNAIL est également impliqué dans la régulation de la survie des cellules, et de leur résistance à la mort cellulaire. Toutes ces informations cumulées m'ont conduit à développer un nouveau projet, dont les objectifs sont d'étudier précisément *Snai1* dans les cellules *Sdhb*^{-/-}, ainsi que les conséquences de son inhibition, afin d'envisager ce facteur de transcription comme une nouvelle cible thérapeutique particulièrement intéressante pour le traitement des PCC/PGL *SDHB*-malins. Ce projet, débuté en fin de thèse, est en cours.

La première partie de ce projet consiste de l'inhibition de SNAIL dans les cellules, ainsi que de ses conséquences fonctionnelles. Afin de répondre à cette problématique, j'ai choisi d'utiliser des particules lentivirales, codant pour des shRNA dirigés spécifiquement contre *Snai1*. Cette technique présente tous les avantages de l'infection virale, qui est rapide et très efficace, et permet par ailleurs d'obtenir une intégration du transgène dans l'ADN de la cellule cible pour permettre son expression de manière stable. Je dispose ainsi de 5 lentivirus différents codant pour un shRNA dirigé contre *Snai1*, ainsi qu'un lentivirus codant pour un shRNA contrôle. Les premiers résultats obtenus à la suite des infections cellulaires m'ont permis de mettre en évidence une très forte létalité cellulaire des cellules *Sdhb*^{-/-} associée à l'inhibition de *Snai1* (pas de létalité avec le shRNA contrôle). J'ai alors observé un phénotype cellulaire très particulier, caractérisé par un arrêt de la prolifération des cellules qui présentent ensuite de très nombreuses vacuoles claires, de tailles plus ou moins importantes. Au bout de quelques jours, j'ai observé la mort des cellules, après dissociation de leur membrane plasmique. Ces premières observations suggèrent une mort cellulaire induite par une dérégulation de l'absorption de fluide extracellulaire (visible par ces vacuoles claires), appelée macropinocytose. Cette mort cellulaire particulière est appelée méthuose (Figure 49).

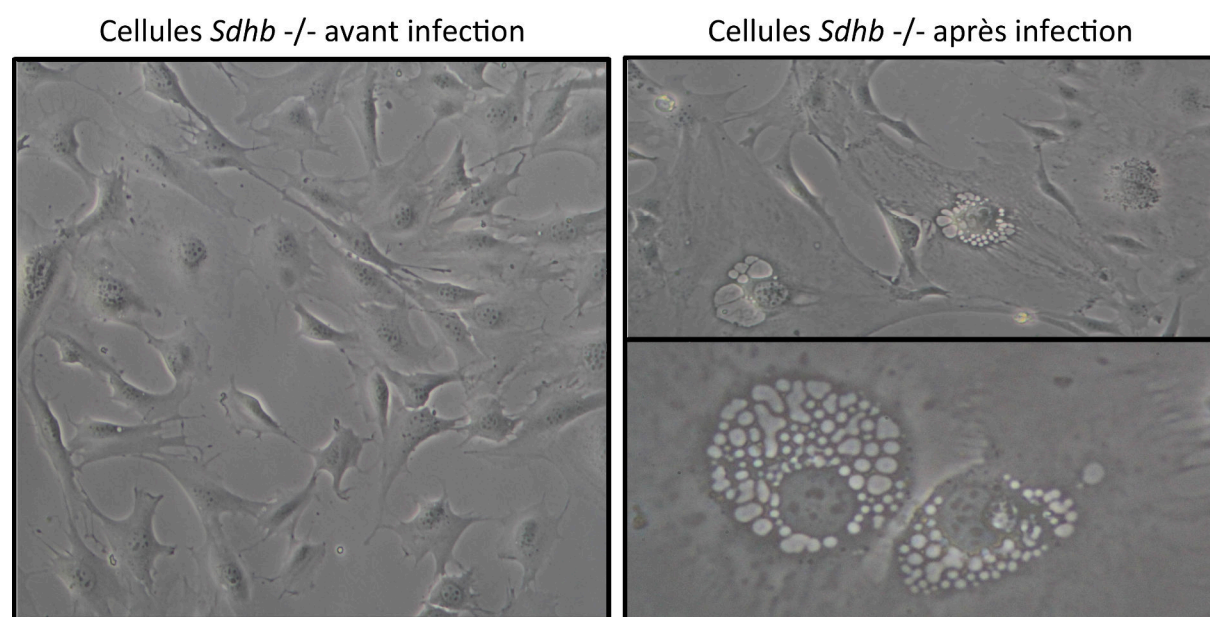


Figure 49 : Visualisation des vacuoles de macropinocytose après inhibition de *Snai1* dans les cellules *Sdhb*^{-/-}

La suite de ce projet sera donc de valider cette hypothèse de mort cellulaire induite par méthuose. Pour cela, il sera nécessaire de vérifier l'incorporation massive et rapide de fluide extracellulaire, et de la quantifier. Cette validation passera également par la confirmation que ces vacuoles sont bien des macropinosomes, et non des endosomes, des lysosomes ou des autophagosomes. Cette distinction pourra être confirmée, par exclusion des autres vésicules, et par inhibition de la macropinocytose (en utilisant un dérivé d'amiloride, comme du 5-(N-éthyle-N-isopropyl)-Amiloride ou EIPA, par exemple). Par la suite il sera important de caractériser la mort cellulaire induite par l'inhibition de Snai1, et de s'assurer qu'il s'agit de méthuose, par exclusion des autres formes de mort cellulaire (comme l'apoptose ou la nécrose) [408-412]. Dans un dernier temps, et avec une visée plus thérapeutique, il sera particulièrement intéressant d'étudier les effets du GN25, un inhibiteur de la voie Snai1/p53, afin de vérifier s'il est possible d'induire pharmacologiquement les mêmes effets cellulaires que lors de l'inhibition de Snai1 à l'aide des shRNA. Cette drogue qui connaît déjà des applications *in vivo* sur des xénogreffes représenterait ainsi une nouvelle molécule potentiellement utilisable pour des essais précliniques *in vitro* et *in vivo*.

La seconde partie de ce projet consiste en l'étude approfondie de Snai1 et notamment de la régulation de sa localisation subcellulaire dans les cellules chromaffines. Pour cela il sera nécessaire d'étudier les différentes formes possibles de Snai1, résultantes de ses modifications post-traductionnelles. En effet, la phosphorylation de Snai1, sur ses différents résidus cibles a un rôle majeur dans la régulation de son interaction avec ses partenaires, eux-mêmes impliqués dans la modulation de sa localisation subcellulaire. Il sera ainsi très intéressant de connaître les résidus de Snai1 phosphorylés, pour en déduire les interactions protéiques résultantes (qui seront à démontrer) et leurs conséquences :

- avec PAK1, pour un adressage nucléaire ;
- avec LOXL2, P70^{S6K}, CK2, PKA ou encore Lats2, pour une stabilisation dans le noyau ;
- avec CRM1, GSK-3 β / β TRCP, FBXL14, PKD1/14-3-3- σ , COP9/CSN2 ou SCP, pour un export vers le cytoplasme et une dégradation par le protéasome.

, ce qui serait une piste intéressante permettant d'expliquer la différence de localisation de SNAIL.

Par ailleurs, et étant donnée l'implication de SNAIL dans la répression des gènes *via* le recrutement de partenaires impliqués dans la méthylation de l'ADN et des histones, l'expression nucléaire de SNAIL dans les tumeurs *SDHB*-malignes pourrait être une explication de la super-hyperméthylation. Il pourrait ainsi être intéressant d'étudier les éventuelles modulations d'expression de ces partenaires dans les cellules *Sdhb*^{-/-} et WT. De la même manière, il serait intéressant d'étudier leurs expressions avant et après inhibition de SNAIL.

Il pourrait être également intéressant de rechercher parmi les gènes cibles de Snai1 (présentant des motifs Ebox dans leurs promoteurs) d'autres gènes candidats, présentant un profil d'expression différentielle entre les tumeurs *SDHB*-malignes et les autres tumeurs *SDHx* ainsi qu'entre les cellules *Sdhb*^{-/-} et *Sdhb* WT, qui pourraient avoir un impact plus important que la kératine 19 sur le phénotype invasif.

V. UN RÔLE POUR LA PROTÉINE SDHB AU-DELÀ DE LA SUCCINATE DÉSHYDROGÉNASE

Mes résultats suggèrent que la stabilisation (ou la rétention) nucléaire de SNAIL est un phénomène dépendant de la perte d'expression de la protéine SDHB. Malgré une analyse minutieuse des données présentes dans la littérature je n'ai trouvé aucune publication relatant d'une fonction de la protéine SDHB différente de son rôle au sein du domaine catalytique de la succinate déshydrogénase. Cependant, il est assez peu probable que la relation existant entre la protéine SDHB et la régulation de la localisation nucléaire de SNAIL, qu'elle soit directe ou non, ait lieu au sein de la mitochondrie, même si cela n'est pas totalement exclu.

Afin d'élucider cette question, il serait très utile de réaliser une étude de double-hybride chez la levure, afin d'identifier d'éventuels nouveaux partenaires de la protéine SDHB, pour lesquels il faudra ensuite valider l'interaction *in vivo*. Au-delà de l'intérêt général de connaître les protéines susceptibles d'interagir avec SDHB, leur identification permettrait d'envisager de nouvelles fonctions pour cette protéine. Dans notre contexte, il serait notamment intéressant de savoir si SDHB est capable d'interagir directement avec SNAIL, ou avec un (des) protéine(s) pouvant être impliquée(s) dans la régulation de sa localisation subcellulaire.

L'importance de la SDH dans les cellules, au sein du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire fait que cette enzyme a été très largement étudiée. Cependant, et comme cela a été décrit pour la fumarate hydratase et pour l'aconitase, il existe des protéines, dont le rôle principal est associé à une localisation subcellulaire donnée (comme par exemple la mitochondrie), mais pour lesquelles il est possible qu'une forme très minoritaire soit également exprimée dans un autre compartiment cellulaire, où elle peut avoir une fonction toute autre. C'est ainsi que sont décrites les « echoprotéines ». La fumarate hydratase présente par exemple une forme cytosolique (sans signal d'adressage à la mitochondrie), capable de rejoindre le noyau et d'être impliquée dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN, un rôle très différent de celui qu'elle occupe dans la mitochondrie, où elle assure l'hydratation du fumarate en malate.

De la même façon, l'étude de Gebert et al., bien que réalisée chez la levure a rapporté que la protéine SDHC pouvait avoir une fonction cellulaire autre que celle de sous-unité de la SDH [372]. Ce qui, à nouveau, suggère qu'une fonction différente de celle de sous-unité catalytique de la SDH est aussi envisageable pour la protéine SDHB.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Lors de mon arrivée au laboratoire, les PCC/PGL porteurs de mutation sur le gène *SDHB* étaient connus comme des tumeurs au potentiel métastatique élevé, associé à un mauvais pronostic pour les patients. Pour ces tumeurs, la seule voie de tumorigenèse identifiée était alors la voie de la « pseudo-hypoxie », qui n'est cependant pas spécifique à ce sous-groupe particulier de tumeurs.

Mes travaux de thèse ont permis l'identification de la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse comme la première voie moléculaire associée à la dissémination métastatique spécifique des tumeurs *SDHB*-malignes. Il me semble cependant aujourd'hui plus juste de parler de « transition neuroendocrino-mésenchymateuse ». Cette première partie de ma thèse m'a également conduit à observer la translocation (ou la rétention) nucléaire de SNAIL dans toutes les tumeurs *SDHB*-malignes, suggérant ainsi que ce marqueur puisse être un outil diagnostique pour la mise en évidence du caractère malin des tumeurs porteuses de mutations sur le gène *SDHB*.

Par la suite, l'étude de la méthylation de l'ADN des PCC/PGL nous a conduit à la mise en évidence du phénotype « hyperméthylateur » des tumeurs *SDHx*. Ce phénomène, par ailleurs accentué dans les tumeurs *SDHB*-mutées, est la conséquence de l'inactivation des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN et des histones, consécutives à l'accumulation de succinate dans ces tumeurs. Nous avons montré que l'hyperméthylation était responsable de l'inhibition de l'expression de nombreux gènes impliqués dans : 1) la différenciation cellulaire, comme le gène *PNMT*, et dont l'extinction explique l'absence de sécrétion de norépinéphrine dans ces tumeurs ; 2) la réparation des cassures doubles brins de l'ADN, comme le gène *MGMT*, dont la méthylation permet de prédire la réponse des tumeurs au témozolomide ; 3) la voie de l'EMT, comme le gène *KRT19*, impliqué dans la stabilisation des jonctions cellulaires de type desmosomes. Au-delà des enzymes responsables de la déméthylation de l'ADN et des histones, l'accumulation de succinate a également un impact sur d'autres dioxygénases dépendantes de l' α -KG, comme les prolyl-hydroxylases du collagène, ce qui suggère que les mutations des gènes *SDHx* et notamment du gène *SDHB* pourraient avoir pour conséquence des altérations de la structure et donc de la fonction de la matrice extracellulaire, dont le remodelage joue un rôle majeur au cours de la progression tumorale.

Enfin, la caractérisation d'un modèle de cellules chromaffines porteuses d'une inactivation complète du gène *Sdhb* m'a permis de faire une description plus complète de l'activation de l'EMT consécutive à l'accumulation de succinate. J'ai ainsi mis en évidence une augmentation des capacités migratoires (collectives et individuelles), invasives et adhésives des cellules *Sdhb*^{-/-}. Lors de l'étude plus spécifique des conséquences fonctionnelles de la perte de la kératine 19, j'ai observé l'impact de cette perte d'expression sur les capacités migratoires et adhésives des cellules. En revanche, cette protéine à elle-seule ne m'a pas permis d'expliquer l'intégralité du phénotype, ce qui suggère l'implication d'autres acteurs, indépendants de celle-ci. Parmi ces autres acteurs, on retrouve en premier lieu *Snai1*, au rôle central dans l'induction de l'EMT. Au-delà de sa fonction première, les résultats préliminaires que j'ai obtenus suite à l'inhibition de *Snai1* dans les cellules *Sdhb*^{-/-}, laissent supposer un rôle important de cette protéine dans la survie et la résistance à la mort cellulaire. La suite de l'étude permettra donc d'obtenir des informations très importantes concernant le(s) rôle(s) de *Snai1* dans le contrôle de la survie et de la mort cellulaire, mais ouvrira également la voie vers de nouvelles options de thérapeutiques.

L'ensemble de mes travaux de thèse aura donc permis d'identifier la première voie moléculaire impliquée dans la malignité des phéochromocytomes et des paragangliomes *SDHB*-dépendants, pour laquelle j'ai étudié les mécanismes moléculaires et cellulaires, ainsi que les conséquences fonctionnelles dans un nouveau modèle cellulaire. Mes travaux ouvrent de nouvelles perspectives particulièrement intéressantes concernant l'EMT et les capacités de dissémination métastatique propres aux tumeurs *SDHB*-mutées. J'espère que les suites de ce projet permettront la découverte de cibles thérapeutiques innovantes, qui un jour pourraient être synonymes de nouveaux traitements pour les patients atteints de ces formes métastatiques particulièrement agressives de PCC/PGL.

ANNEXES

Au cours de mon travail de thèse, j'ai eu l'occasion de participer à d'autres projets, en collaboration avec des membres de notre équipe, mais également avec des équipes externes.

Ces collaborations ont notamment donné lieu à deux publications.

I. L'IMPORTANCE DES MUTATIONS SOMATIQUES DU GÈNE *NF1*

***Burnichon N, *Buffet A, et al.**

"Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma"

Hum Mol Genet. 2012 Dec 15;**21**(26):5397-405.

Somatic *NF1* inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma

Nelly Burnichon^{1,2,3,*}, Alexandre Buffet^{1,2,3,†}, Béatrice Parfait^{4,5}, Eric Letouzé⁶, Ingrid Laurendeau⁵, Céline Lorient^{1,2}, Eric Pasmant^{4,5}, Nasséra Abermil^{1,2,3}, Laurence Valeyrie-Allanore⁷, Jérôme Bertherat^{2,8,9,10}, Laurence Amar^{1,2,11}, Dominique Vidaud^{4,5}, Judith Favier^{1,2,‡} and Anne-Paule Gimenez-Roqueplo^{1,2,3,10,‡}

¹INSERM, UMR970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris F-75015, France, ²Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris F-75006, France, ³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, Paris F-75015, France, ⁴INSERM, UMR745, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris F-75006, France, ⁵Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Paris F-75014, France, ⁶Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre Le Cancer, Paris F-75013, France, ⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Mondor, Centre de référence des Neurofibromatoses, Créteil F-94010, France, ⁸INSERM, U1016, CNRS UMR8104, Département d'Endocrinologie, Métabolisme & Cancer, Institut Cochin, Paris F-75014, France, ⁹Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Centre de Référence Maladies Rares de la Surrénale, Service des Maladies Endocriniennes et Métaboliques, Paris F-75014, France, ¹⁰Rare Adrenal Cancer Network-Cortico Médullosurrénale Tumeur Endocrine, Institut National du Cancer, Paris F-75014, France, and ¹¹Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Hypertension Artérielle, Paris F-75015, France

Received July 17, 2012; Revised and Accepted August 30, 2012

Germline mutations in the *RET*, *SDHA*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *MAX*, *TMEM127*, *NF1* or *VHL* genes are identified in about 30% of patients with pheochromocytoma or paraganglioma and somatic mutations in *RET*, *VHL* or *MAX* genes are reported in 17% of sporadic tumors. In the present study, using mutation screening of the *NF1* gene, mapping of chromosome aberrations by single nucleotide polymorphism (SNP) array, microarray-based expression profiling and immunohistochemistry (IHC), we addressed the implication of *NF1* somatic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. We studied 53 sporadic tumors, selected because of their classification with *RET/NF1/TMEM127*-related tumors by genome wide expression studies, as well as a second set of 11 independent tumors selected on their low individual levels of *NF1* expression evaluated by microarray. Direct sequencing of the *NF1* gene in tumor DNA identified the presence of an inactivating *NF1* somatic mutation in 41% (25/61) of analyzed sporadic tumors, associated with loss of the wild-type allele in 84% (21/25) of cases. Gene expression signature of *NF1*-related tumors highlighted the downregulation of *NF1* and the major overexpression of *SOX9*. Among the second set of 11 tumors, two sporadic tumors carried somatic mutations in *NF1* as well as in another susceptibility gene. These new findings suggest that *NF1* loss of function is a frequent event in the tumorigenesis of sporadic pheochromocytoma and strengthen the new concept of molecular-based targeted therapy for pheochromocytoma or paraganglioma.

*To whom correspondence should be addressed at: INSERM U970—PARCC, 56, rue Leblanc, 75015 Paris, France. Tel: +33 156093881; Fax: +33 156093884; Email: nelly.burnichon@inserm.fr

†These authors contributed equally to this work.

‡These authors should be considered equal last authors.

INTRODUCTION

Parangliomas are neural crest-derived tumors arising from sympathetic and parasympathetic paraganglia. Parangliomas developed in the adrenal medulla are called pheochromocytomas. About one-third of these tumors occur in a hereditary context and are then linked to a germline mutation in one of the ten susceptibility genes known to date: the *RET* proto-oncogene (1) and the *SDHA* (2), *SDHB* (3), *SDHC* (4), *SDHD* (5), *SDHAF2* (6), *NF1* (7), *VHL* (8), *TMEM127* (9) and *MAX* (10) tumor suppressor genes.

Germline mutations in one of these susceptibility genes were described in patients with familial tumor syndromes including multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2), von Hippel Lindau (VHL) disease, neurofibromatosis type 1 (NF1) and familial paranglioma/pheochromocytoma, but also in 11–19% of patients with a sporadic presentation of pheochromocytoma or paranglioma (11–16).

Until recently, proven somatic mutations (i.e. mutations found in tumor DNA but not in the corresponding germline DNA) in sporadic pheochromocytoma/paranglioma were identified in *VHL*, *RET*, *SDHB* and *SDHD* but their frequency was reported to be low (17–20). However, we lately reported the occurrence of somatic mutations in *VHL* and *RET* genes in 14% of sporadic pheochromocytoma/paranglioma from the COMETE cohort (21). Subsequently, we reported one germline and three somatic mutations in the *MAX* gene within the same cohort (22).

In the present study, using direct sequencing of the *NF1* gene and single nucleotide polymorphism (SNP) array to determine the associated loss of heterozygosity (LOH), we report, for the first time, the high level of *NF1* somatic alterations in pheochromocytoma. We demonstrate that 41% (25/61) of the sporadic tumors we analyzed harbor an inactivating somatic mutation in the *NF1* gene associated with loss of the wild-type allele in 84% (21/25) of cases.

RESULTS

High frequency of *NF1* somatic mutations in pheochromocytoma

To assess the contribution of *NF1* somatic mutations in sporadic pheochromocytoma/paranglioma, *NF1* genotyping was performed in a first set of 53 samples. These samples were selected from a large cohort of 202 pheochromocytomas and parangliomas because, (1) they were classified with *RET*/*NF1*/*TMEM127*-related tumors (Cluster 2A) in genome wide expression studies (21); and (2) they harbored neither germline mutation in the main pheochromocytoma/paranglioma susceptibility genes nor somatic mutation in *RET*, *TMEM127* and *MAX* genes (Supplementary Material, Table S1). The results are presented in Table 1.

Twenty-four truncating mutations were identified in the *NF1* gene by direct sequencing, including 13 small deletions, one small insertion and one indel, all resulting in a premature stop codon; 4 nonsense mutations; 3 splice mutations leading to exon skipping, confirmed in each case by cDNA analysis; 2 mutations (c.205–1G>C and c.1885G>A) leading to the creation of a new splice acceptor site and resulting,

respectively, in a premature stop codon (p.Arg69Asnfs*7) and in a partial exon 12b deletion with premature stop codon (p.Gln616Glyfs*4), described previously (23). One in-frame deletion of two amino acids (c. 7096_7101del, p.Asn2366_2367del) was also found, previously described as likely deleterious (24).

Finally, we identified one missense variation (c.7532C>T, p.Ala2511Val, rs148154172) with unknown significance, so, it was not considered in further analyses.

In one tumor sample (#167), cDNA analysis revealed two abnormalities in the *NF1* gene: the c.5184insA mutation in exon 28 and an exon 19A deletion. The last one was slightly visible on the corresponding electropherograms. The analysis of the corresponding tumor DNA clearly showed the presence of the c.5184insA while the c.3196+2T>G in intron 19A was detected, but at a very low level (Fig. 1A). In the patient's leucocyte DNA, the c.5184insA was absent but the c.3196+2T>G heterozygous mutation was found (Fig. 1A). The germline status of the *NF1* mutation was also proven in two other patients (#002 and #012) (Table 1). In these three patients without previous clinical diagnosis of neurofibromatosis type 1, clinical re-examination revealed very mild features of the disease including clear café-au-lait spots and small perigenito-axillaris lentiginosis. Two of them (#002 and #012) reported a NF1 familial history, which was unknown at the time of pheochromocytoma diagnosis.

Supervised analysis reveals that *NF1* and *SOX9* are the most under- and over-expressed genes in *NF1*-mutated tumors, respectively

In light of the samples of our cohort newly associated with *NF1* mutations, we re-analyzed the expression data for the 78 tumors classified in Cluster 2A in our previous study (21). A supervised analysis identified genes significantly deregulated in *NF1*-mutated tumors. Using a moderate T-test, we found 470 genes significantly upregulated, and 1,021 genes significantly downregulated in *NF1*-mutated tumors compared with other tumors from Cluster 2A (FDR-adjusted *P*-value <0.05, Supplementary Material, Table S2). Gene ontology (GO) analysis identified extracellular matrix organization, collagen biosynthetic process, cell adhesion and Wnt receptor signaling pathway as the most significant terms associated with the 470 upregulated genes (*P* < 0.01). The gene most strongly overexpressed in *NF1*-mutated tumors was the neural crest transcription factor *SOX9* (Table 2). The 1,021 genes significantly underexpressed in *NF1*-mutated tumors were associated with intracellular protein transport, ncRNA metabolic process, translation and generation of precursor metabolites and energy (*P* < 0.01). The *NF1* gene was the most strongly underexpressed gene in *NF1*-mutated tumors (Table 2).

Analysis of individual microarray values of *NF1* expression in Cluster 2A tumors (Fig. 2) revealed that evaluation of *NF1* mRNA levels was a powerful criterion to identify *NF1*-related tumors (harboring germline or somatic mutations). We thus searched for *NF1* mutations in 11 additional samples, which harbored a low level of *NF1* mRNA expression. They comprised three hereditary tumors with germline mutation (one in *SDHB* and two in *VHL*) and eight sporadic tumors

Table 1. Somatic and germline events in the *NF1* gene identified in 33 sporadic pheochromocytomas and paragangliomas (first set)

Patient ID	Tumor location	B/M status	LOH at the <i>NF1</i> locus	<i>NF1</i> somatic mutations (nucleotide)	<i>NF1</i> somatic mutations (protein) (previously reported)	Likely consequence on the protein function ^a	Association of two genetic events in the <i>NF1</i> gene	Presence of the mutation in the germline DNA
036	Adrenal	B	LOH	—	—		No (LOH only)	NA
051	Adrenal	B	LOH	—	—		No (LOH only)	NA
057	Adrenal	B	LOH	—	—		No (LOH only)	NA
131	Adrenal	B	LOH	—	—		No (LOH only)	NA
139	Adrenal	B	LOH	—	—		No (LOH only)	NA
146	Adrenal	M	LOH	—	—		No (LOH only)	NA
187	Adrenal	B	LOH	—	—		No (LOH only)	NA
011	Adrenal	B	No	c.7532C>T	p.Ala2511Val		No (UV only)	Yes
037	Adrenal	B	No	c.7843_7855del	p.Gln2614Metfs*4	COOH-term affected	No (truncating mutation only)	No
099	Adrenal	B	No	c.8046_8047delinsTT	p.Gln2703*	COOH-term affected	No (truncating mutation only)	No
199	Adrenal	B	No	c.971_976del	p.Cys324*	Loss of GTPase-activating protein-related domain (GRD)-domain	No (truncating mutation only)	No
053	Adrenal	B	LOH	Whole gene deletion	No protein	No protein	Yes	No
110	Adrenal	B	LOH	c.7096_7101del	p.Asn2366_2367del (23)	Unknown	Yes	No
017	Adrenal	B	LOH	c.22409+1G>A	p.Ala776_Gln803del	Cystein serine rich domain (CSRD)-domain affected	Yes	No
003	Adrenal	B	LOH	c.7393del	p.Arg2465Glyfs*3	COOH-term affected	Yes	No
033	Adrenal	B	LOH	c.3158C>A	p.Ser1053*	Loss of GRD-domain	Yes	No
045	Adrenal	B	LOH	c.3398_3399del	p.Glu1133Aspfs*61	Loss of GRD-domain	Yes	No
049	Adrenal	M	LOH	c.489del	p.Glu163Aspfs*2	Loss of GRD-domain	Yes	No
056	Adrenal	B	LOH	c.2546del	p.Gly849Glyfs*29	Loss of GRD-domain	Yes	No
061	Adrenal	B	LOH	c.7519C>T	p.Gln2528*	COOH-term affected	Yes	No
068	Adrenal	B	LOH	c.7583C>G	p.Ser2549*	COOH-term affected	Yes	No
072	Adrenal	B	LOH	c.5675_5678del	p.Lys1913Asnfs*11	COOH-term affected	Yes	No
120	Adrenal	B	LOH	c.392_408del	p.Ala131Glyfs*18	Loss of GRD-domain	Yes	No
147	LN met.	M	LOH	c.3721C>T	p.Arg1241* (47)	Loss of GRD-domain	Yes	No
154	Adrenal	B	LOH	c.397del	p.Ala132Leufs*33	Loss of GRD-domain	Yes	No
161	Adrenal	B	LOH	c.2533del	p.Cys845Valfs*33	Loss of GRD-domain	Yes	No
162	Adrenal	B	LOH	c.1885G>A	p.Gln616Glyfs*4 (23,47,48)	Loss of GRD-domain	Yes	No
169	Adrenal	B	LOH	c.205-1G>C	p.Arg69Asnfs*7	Loss of GRD-domain	Yes	No
174	Adrenal	B	LOH	c.2939_2958del	p.Ser980*	Loss of GRD-domain	Yes	No
180	Adrenal	B	LOH	c.6800_6801del	p.Gln2287Argfs*18	COOH-term affected	Yes	No
002	Adrenal	B	LOH	c.3025del	p.Ile1009Phefs*3	Loss of GRD-domain	Yes	Yes
012	Adrenal	B	LOH	c.2991-1G>C	p.Tyr998_Arg1038del (49)	Unknown	Yes	Yes
167	Adrenal	B	LOH	1) c.3196+2T>G 2) c.5184insA	1) p.Asn1039_Arg1065del 2) p.Asp1728Argfs*7	1) Unknown 2) COOH-term affected	Yes	Yes (Mut #1)

LOH and/or genetic alterations were identified in 33/53 analyzed tumors.

NCBI reference sequences: NM_000267.3 and NP_000258.1.

LOH, loss of heterozygosity; UV, unknown variant; NA, not applicable; LN, lymph node; Met, metastasis; B, benign; M, malignant.

^aThe GRD central domain of the protein is coded by exons 20–27a (50). Any truncating mutation in this domain will affect the GAP function of the protein. Upstream of this GRD-domain, a CSRD coded by exons 11–17 has been described (49). However, its role remains unknown. Truncating mutations identified downstream of the GRD-domain will affect the COOH terminal part (COOH-term) of the protein inside of which domains are not clearly identified. This COOH part of neurofibromin contains several potential phosphorylation sites.

without germline mutation, including four with a previously identified somatic mutation (one in *RET* and three in *VHL*). We identified two *NF1* somatic mutations (c.4600delG; p.Ala1534Glyfs*19) and (c.289_888del; p.Gln97_Lys296del) in two out of the four sporadic tumors carrying a previously identified somatic mutation, one in *RET* and one in *VHL* gene (Supplementary Material, Table S3).

In order to obtain an easy tool, transferable to routine practice, we further evaluated neurofibromin and Sox9 expression at protein level by immunohistochemistry (IHC) on 18 paraffin-embedded tumor samples, which included samples with germline ($n = 4$) and somatic ($n = 7$) mutations in the *NF1* gene (Supplementary Material, Table S4). Tumors were classified according to the level of expression of

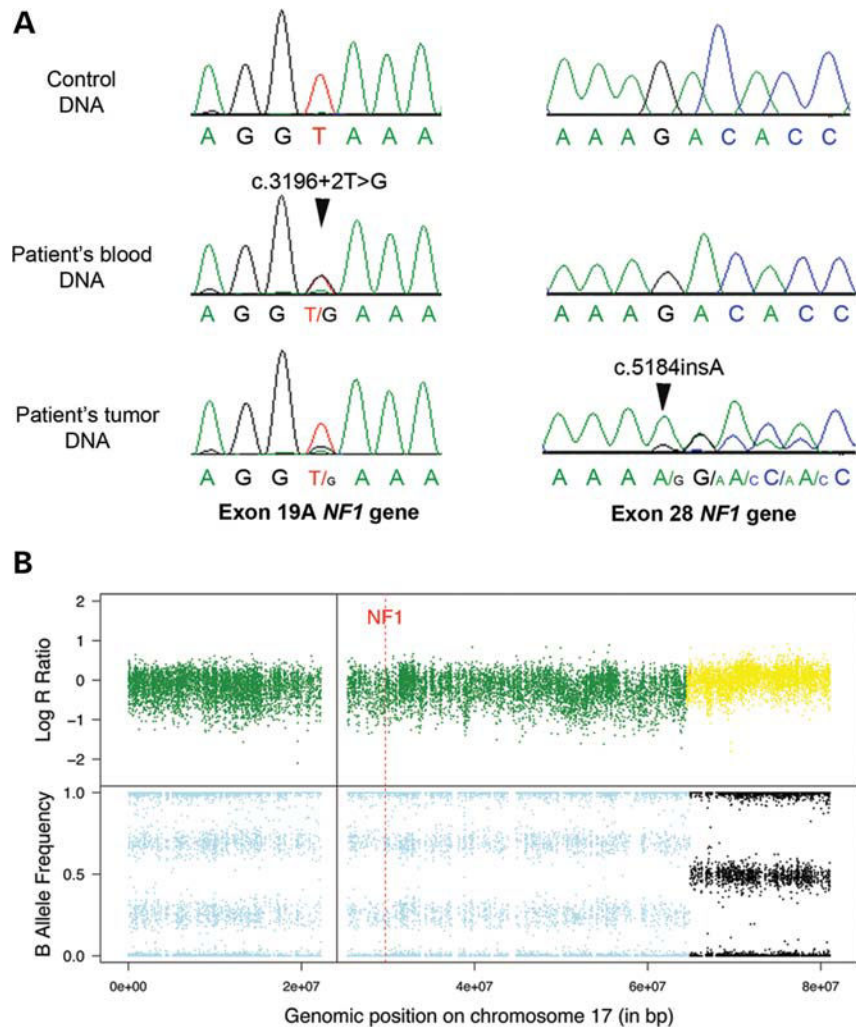


Figure 1. Genetic events in a tumor sample associating *NF1* germline mutation, *NF1* somatic mutation and LOH at *NF1* locus. (A) Direct sequencing electropherograms of *NF1* in the two areas of mutations (exon 19A and exon 28) for patient #167. The middle and the bottom panels show the patient's blood DNA and the patient's tumor DNA analyses, respectively, revealing the presence of the c.3196+2T>G mutation in the germline DNA and the c.5184insA mutation in the tumor DNA only. In the patient's tumor DNA, the predominance of the wild-type allele c.3196+2T combined with the presence of the somatic mutation c.5184insA indicates that the two mutations are carried by two different alleles and that the allele lost by LOH mechanism (panel B) carries the germline mutation c.3196+2T>G. (B) LRR and BAF profiles along chromosome 17 showing LOH at *NF1* locus in tumor #167. Yellow: no copy number alteration; green: LOH; light blue (BAF plots): LOH; black (BAF plots): heterozygosity.

neurofibromin or Sox9 (Supplementary Material, Table S4 and Fig. S1). Almost all non-*NF1* mutated samples displayed no or low expression of neurofibromin (6/7) and no or low expression of the Sox9 protein (5/7). We found *NF1*-mutated tumors with no ($n = 2$), low ($n = 4$) or high ($n = 5$) expression of the neurofibromin. Eight out of the 11 *NF1*-mutated samples expressed Sox9.

Loss of heterozygosity (LOH) at the *NF1* locus is significantly associated with *NF1* mutations

The SNP array analysis of the 78 tumors belonging to Cluster 2A revealed LOH at the *NF1* locus (17q11.2) in 38 tumors (49%). Twenty-two LOH were large, spanning the whole chromosome 17 or, at least, the entire 17q arm (Supplementary Material, Fig. S2A), whereas 16 LOH were restricted to the area flanking the *NF1* gene locus (focal LOH < 20 Mb,

Supplementary Material, Fig. S2B). Moreover, we detected a homozygous deletion of the *NF1* gene in one tumor (#053, Supplementary Material, Fig. S2C and Table 1).

LOH at the *NF1* locus was significantly more frequent in *NF1*-mutated tumors, whatever the germline or somatic status of the mutation (32/35, 91%), than in other tumors of expression Cluster 2A (6/43, 14%) ($P = 2.26 \times 10^{-12}$, Fisher's exact test).

Other recurrent chromosome rearrangements in these tumors included -1p, +1q, -3q, -6q, -17p, -21 and -22, and displayed similar frequencies in *NF1*-, *RET*-, and tumors without mutation (Supplementary Material, Fig. S3).

For sample #167, which carried two different *NF1* mutations, the SNP array analysis showed the presence of a large 17q LOH (Fig. 1B). The comparison of the *NF1* sequence electropherograms from the germline and the tumor DNA revealed the loss, by LOH mechanism, of the allele carrying

Table 2. Top genes significantly deregulated in *NF1*-mutated tumors

Genes overexpressed in <i>NF1</i> -mutated tumors			Genes underexpressed in <i>NF1</i> -mutated tumors		
Gene symbol	Fold change (NF1/others)	FDR-adjusted <i>P</i> -value	Gene symbol	Fold change (NF1/others)	FDR-adjusted <i>P</i> -value
SOX9	3.14	0.0189	NF1	0.33	3.65E-06
COL1A1	2.66	0.0043	GDF10	0.36	0.0226
DHRS2	2.66	0.0234	SLC35D3	0.41	0.00383
MME	2.58	0.0215	FUT9	0.46	0.0159
COL3A1	2.41	0.00712	CCDC68	0.47	0.0166
COL1A2	2.33	0.0138	RSAD2	0.47	0.0243
POSTN	2.23	0.0468	MR1	0.48	5.45E-05
COL1A1	2.22	0.00967	NTRK1	0.48	0.0278
SFRP2	2.17	0.0404	ANKRD29	0.48	0.0159
DUXAP10	2.14	6.19E-04	SGK494	0.5	0.0138
SLITRK6	2.11	0.0255	ALDOC	0.51	1.64E-05
DCN	2.04	0.0442	HERC5	0.51	0.0017
MXRA5	2.01	0.021	TMEM35	0.51	0.0461
FNDC1	1.99	0.0023	KRT222	0.52	5.39E-05
ACHE	1.95	0.0404	CD24	0.52	0.037
CTHRC1	1.93	0.0272	SFRP5	0.52	0.038
GPNMB	1.93	0.0414	TMEM100	0.53	0.0232
BCL8	1.91	0.0378	MX1	0.53	0.0166
TLL2	1.87	0.0138	TRIM6	0.53	0.0314
SPRY2	1.87	0.00416	CPD	0.54	1.54E-04

the germline mutation (c.3196+2T>G) in the tumor tissue and the presence of a second mutation (c.5184insA) only in the tumor DNA (Fig. 1A).

DISCUSSION

In our cohort of sporadic pheochromocytoma/paraganglioma, we previously established the significant contribution of somatic mutations in the *VHL* (11/119, 9.2%), *RET* (6/119, 5%) and *MAX* (3/119, 2.5%) genes (21,22). In the present study, we completed the genetic characterization of the cohort and identified a *NF1* inactivating somatic mutation in 25/61 of sporadic tumors we analyzed, associated in a majority of cases with LOH at the *NF1* locus. The genetic characterization of the COMETE cohort comprising 202 tumors we performed to date is summarized in Figure 3. Among the *NF1*-related sporadic tumors, 23 were pheochromocytomas, 1 was an abdominal paraganglioma and 1 was a lymph node metastasis of a pheochromocytoma diagnosed 13 years before. Three out of the 25 tumors were malignant. Altogether, these data clearly show that 36% (43/119) of sporadic pheochromocytoma/paraganglioma harbor, at least, one somatic mutation in pheochromocytoma/paraganglioma susceptibility genes. Fifty-six percent of all somatic mutations identified in our series are carried by the *NF1* gene, which should be now considered as the foremost-inactivated gene in sporadic pheochromocytoma.

To our knowledge, the involvement of *NF1* somatic alterations was never reported in pheochromocytoma/paraganglioma. However, somatic *NF1* mutations were previously identified in 41% (9/22) of sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors that are, as pheochromocytomas, neoplasms associated with neurofibromatosis type 1 (24). Various studies have also identified somatic *NF1* alterations in non-neurofibromatosis-associated cancers. Somatic *NF1* inactivating mutations or

deletions were described in 15–23% of glioblastoma (25,26), 22% of ovarian serous carcinomas (27), 8% of lung adenocarcinomas (28), 5% of neuroblastoma (29) as well as in acute myeloid leukemia (30). These data showed that aberration in the *NF1* tumor suppressor gene is a key genetic event in tumorigenesis of various cancers, including pheochromocytoma.

Among the *NF1* mutations identified in this study, three occurred at a germline level while the clinical diagnosis of neurofibromatosis type 1 had not been previously established for these patients. It is important to note that, in contrast to *SDHx*, *RET*, *VHL*, *MAX* and *TMEM127*, the *NF1* mutation screening is not performed routinely by molecular genetics laboratories worldwide involved in pheochromocytoma/paraganglioma genetic diagnosis. Indeed, as clinical features of neurofibromatosis type 1 are usually obvious, this diagnosis is currently restricted to the evaluation of clinical criteria (31). Moreover, the mutation analysis of *NF1* by the Sanger method remains a challenge for laboratories, due to the large size of the gene (60 coding exons spanning over 350 kb, 2839 amino acids), the lack of mutation hotspots and the existence of multiple pseudogenes (32). To our knowledge, only one group reported *NF1* mutation screening in patients with apparently sporadic pheochromocytomas (33). Of the 27 cases, Bausch *et al.* found one (4%) with a *NF1* germline mutation. Clinical re-evaluation of the patient revealed classic, but very mild features of NF1 disease (33). The description, in the present study, of three similar cases confirms that *NF1* germline mutation is not common in apparently sporadic pheochromocytomas and strengthens that a very careful clinical investigation of typical neurofibromatosis type 1 features must be conducted in each patient with pheochromocytoma.

Gene expression and biological pathway analyses performed in *NF1*-related pheochromocytomas revealed the activation of genes involved in cell differentiation, cell adhesion and motility as well as in cellular and organ developmental

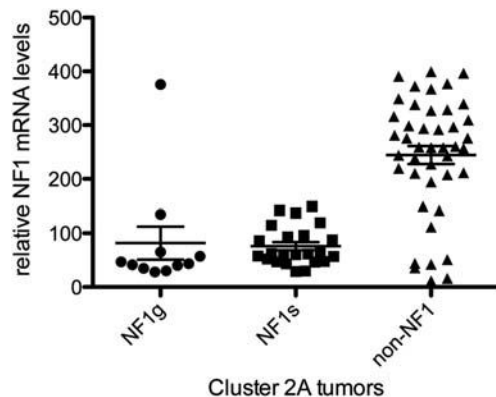


Figure 2. Microarray evaluation of NF1 mRNA expression in Cluster 2A tumors. Relative mRNA levels are indicated for tumors harboring a germline (NF1g, $n = 12$), a somatic (NF1s, $n = 22$) or no mutation in the *NF1* gene (non-NF1, $n = 44$).

processes. This may explain the slight increase in malignant forms of pheochromocytomas observed in *NF1*-mutated patients, when compared with *RET*-related ones. Interestingly, *SOX9* gene turned out to be the most highly increased in *NF1*-mutated tumors. Consistently, this gene was also overexpressed in pheochromocytomas developed in *Nf1* knockout mice (34). It was identified as a potential biomarker strongly expressed in neurofibromatosis type 1 relative tumors, and possibly as a therapeutic target in NF1 disease (35). However, Sox9 immunostaining is not sufficient to identify all *NF1*-mutated pheochromocytomas.

NF1 was the most significantly underexpressed gene in *NF1*-mutated tumors. Individual values suggested that analysis of its mRNA expression could be a useful tool to suggest the presence of a germline or a somatic *NF1* mutation. The identification of two additional *NF1* mutations in tumors with low NF1 mRNA expression confirmed this hypothesis. Unfortunately, we were not able to validate this observation at the protein level and neurofibromin IHC was unsuccessful in identifying *NF1*-mutated samples. To our knowledge, we used the only neurofibromin antibody validated for IHC on paraffin-embedded tissues. Hence, in contrast to SDHB, SDHA and MAX IHC, which can help targeting mutation analysis in *SDHx* and *MAX* genes, respectively (22,36,37), neurofibromin IHC is not an efficient tool to select *NF1*-mutated tumors. However, the sensibility and specificity of neurofibromin and Sox9 IHC should be assessed in larger series of tumors and further investigations should be performed to identify and validate a transferable *NF1*-mutation prediction tool.

Altogether our data reveal an important contribution of somatic mutations in the genetics of pheochromocytoma and paraganglioma. The combination of all germline and somatic mutation analyses conducted in the COMETE cohort revealed the involvement of one of the ten known susceptibility genes in 60% of cases (121/202), including 78/202 (38.6%) tumors with a germline mutation and 43/202 (21.3%) with a somatic mutation (Fig. 3). We found germline or somatic *NF1* mutations in 37 tumors, making *NF1* the second gene involved in the disease, after *VHL* (40 mutations) and before *SDHB* (18 mutations) and *RET* (16 mutations). The other genes (*SDHA*, *SDHC*, *SDHD*, *MAX* and *TMEM127*) account

for less than five mutations each. Our data also showed the possible association of two somatic mutations in two different pheochromocytoma susceptibility genes (*RET* and *NF1*; *VHL* and *NF1*) contributing to the tumorigenesis of one sporadic tumor. In the next future, predictive molecular markers should be developed to assess a tailored therapeutic program based on the molecular characterization of the initial tumor that probably should include next generation sequencing methods.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Ethical approval for the study was obtained from the institutional review board (CPP Paris-Cochin, January, 2007). All patients provided a written informed consent for the collection of samples and subsequent analyses.

Patients and tumor samples

The tumor and blood samples were prospectively collected by the French “*Cortico et Médullosurrénale: les Tumeurs Endocrines*” (COMETE) network. The procedures used for pheochromocytoma/paraganglioma diagnosis were in accordance with institutional guidelines and have been described previously (38). Diagnosis was confirmed by histology in every case. Tumor samples were obtained from patients with pheochromocytomas and/or abdominal or thoracic paragangliomas collected by the Georges Pompidou European Hospital and by the Cochin Hospital, Paris, France. Fresh tumor samples were collected during surgery, immediately frozen and stored in liquid nitrogen until processed. The entire cohort of pheochromocytoma/paraganglioma (referred to as the ‘COMETE cohort’) includes 202 tumor samples from 190 different and consecutive patients recruited by the COMETE network from 1993 to 2008 as previously described (21). The present study was first focused on 53 tumor samples selected as follows: (1) lack of germline mutations in *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* and *MAX* genes; (2) classification, by unsupervised hierarchical clustering analysis based on the gene expression, with tumors presenting *RET*, *NF1* or *TMEM127* germline mutations (i.e. Cluster 2A); and (3) absence of *RET*, *MAX* and *TMEM127* mutations in tumor DNA.

The second set of tumors we analyzed comprised 11 samples, one with a *SDHB* germline mutation, two with a *VHL* germline mutation, three with a *VHL* somatic mutation, one with a *RET* somatic mutation and four without identified mutation.

Among the 64 tumor samples, 60 were adrenal pheochromocytomas, 2 were abdominal paragangliomas, 1 was a lymph node metastasis and 1 was a thoracic paraganglioma.

Nucleic acids extraction

Blood DNA, tumor DNA and tumor RNA were extracted as described previously (2).

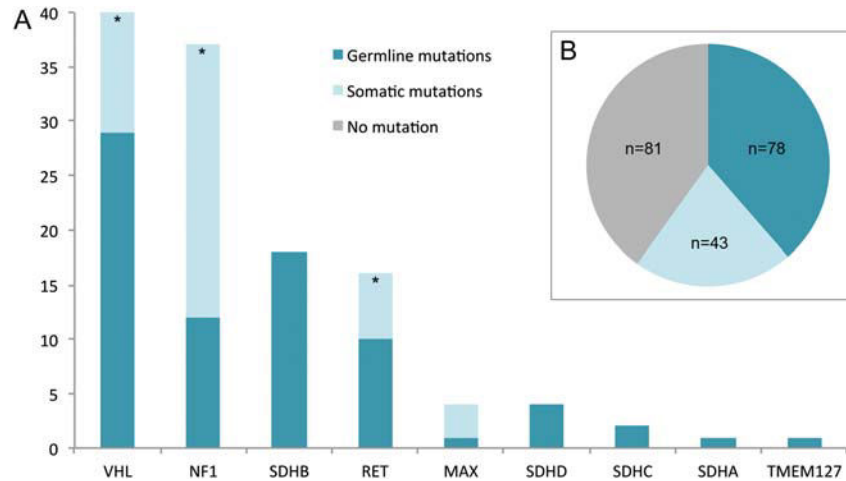


Figure 3. Genetic characterization of the COMETE cohort. (A) Partition of germline and somatic mutations affecting the main pheochromocytoma/paraganglioma susceptibility genes identified in the whole cohort of 202 tumors recruited by the COMETE network. *Two somatic mutations were identified in two different tumors: one presenting mutations in *NF1* and *RET* and another one harboring mutations in *NF1* and *VHL* genes. (B) A germline mutation in one of the ten pheochromocytoma/paraganglioma susceptibility genes was found in 78 patients, while 43 tumors harbored a somatic mutation. No mutations were identified to date in the remaining set of 81 tumors.

Gene expression analysis

Microarray analyses were performed with HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix GeneChip arrays (Affymetrix) as described previously (21). A moderate T test, as implemented in the limma Bioconductor package (39), was used to identify significantly deregulated genes between *NF1*-mutated and wild-type tumors. We then used DAVID software (40) to detect GO terms significantly enriched in the lists of up- and downregulated genes.

SNP array analysis

Tumor samples were analyzed with Illumina Human610-Quad v1.0 chips, containing 620 901 probes. Hybridization was performed by IntegraGen (Evry, France), according to the instructions provided by the array manufacturer. Raw fluorescent signals were imported into Illumina BeadStudio software and normalized, as previously described (41), to obtain the log R ratio (LRR) and B allele frequency (BAF) for each SNP. The tQN normalization procedure was then applied to correct for the asymmetry in BAF signals due to the bias between the two dyes used in Illumina assays (42). LOH were determined as previously described (43). In brief, allele-specific copy numbers were determined using the Genome Alteration Print (GAP) method (44). We then considered a chromosome region to have undergone LOH when the copy number of the minor copy of the segment was <0.5 . Note that throughout this paper, LOH refers to any chromosome region in which one of the parental copies has been completely lost, whatever the copy number of the retained chromosome. Fisher's exact test was used to compare the frequencies of LOH in diverse tumor subgroups. The SNP data from the 78 tumors analyzed in this study have been deposited in NCBI's gene expression omnibus (GEO) (45) and are accessible through GEO series accession number [GEO: GSE38525].

NF1 genetic analysis

NF1 somatic mutation analysis was performed by sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as previously described (46). We performed *NF1* mutation screening at both RNA and DNA levels. For each *NF1* mutation found in tumor DNA, the corresponding leucocyte DNA was also checked for the presence of the mutation. Mutational screening of *NF1* was carried out on RNA through the following procedure. After reverse transcription with Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen), eight overlapping PCR fragments were generated by using FastStart Taq DNA polymerase (Roche). Mutation screening was performed with the ABI BigDye terminator sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI Prism 3130 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequences were aligned with Seqscape[®] analysis software (Applied Biosystems) and were compared with the corresponding cDNA reference sequence NM_000267. The double strands sequencing of the eight large (from 970 to 1755 bp) overlapped RT-PCR fragments led to characterize almost all the cDNA sequence, except alternative exons 23a, 29 and 30 that were, therefore, sequenced on genomic DNA. Tumor and leucocyte DNA were amplified with specific primers for the 60 coding exons of the *NF1* gene and their intervening sequence boundaries, including alternative exon 23a. Owing to the multiple *NF1* pseudogenes, the transcript product of the *NF1* gene was first sequenced. The double strands sequencing of the RT-PCR products avoids co-amplification of the non-processed pseudogenes. The confirmation of mutations identified at the cDNA level was performed at the DNA level by using specific sense and antisense oligonucleotides of the *NF1* active copy. The primer oligonucleotide sequences and PCR conditions are available on request. Sequences were aligned with Seqscape[®] analysis software (Applied Biosystems) and were compared with the corresponding genomic DNA reference sequences NC_000017.10. In the absence of evidence for pathogenic effect of *NF1* variants

identified, *in silico* predictions were performed (ALAMUT® software).

NF1 deletion screening was performed by MLPA analysis using the SALSA MLPA kit P081 NF1 mix 1 and SALSA MLPA kit P082 NF1 mix 2, as recommended in the manufacturer's protocol (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands).

Immunohistochemistry

For IHC study, we used 6 µm sections of paraffin-embedded tissues, mounted on Superfrost plus glass slides.

We used anti-neurofibromin (Santa Cruz Biotechnologies, sc-20982, 1:250) and anti-Sox9 (Millipore, AB5535, 1/500) antibodies and performed heat-mediated antigen retrieval using Tris-EDTA buffer (pH9) for 45 min and citrate buffer (pH6) for 15 min, respectively. As they react with the avidin–biotin–peroxidase complex (Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories), we used biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories). Peroxidase activity was detected with Histogreen (Abcys). A negative control was performed by omitting the primary antibody. A Leica DM400B microscope was used to perform acquisitions, with 40X objective, thanks to Leica Application Suite software version 2.8.1 and Leica DFC420C camera.

Neurofibromin and Sox9 IHC were performed on 18 paraffin-embedded tumor samples, including 4 samples with NF1 germline mutation, 7 samples with NF1 somatic mutation and 7 non-NF1 mutated samples (2 RET-, 1 VHL-, 1 SDHB-related tumors and 3 tumors without mutation). Slides were coded and classified blindly by two independent observers, according to the level of expression of the protein. Slides presented no expression (score = 0), a low (score = 1) or a high (score = 2) cytoplasmic expression of neurofibromin. For Sox9 expression, slides presented no expression (score = 0), a low (score = 1) or a high (score = 2) nuclear expression of the protein.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at HMG Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We express our gratitude to Prs Pierre-François Plouin and Xavier Bertagna for the COMETE Network and Pr X. Jeunemaitre for helpful discussions and long time support. We thank Pr Michel Vidaud, Dr Rossella Libé, Pr Cécile Badoual and Dr Frédérique Tissier for their contribution to this study. Alexandre Buffet is a recipient of a fellowship from “la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer”.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work is part of the national program “Cartes d'Identité des Tumeurs” funded and developed by the “Ligue Nationale contre le Cancer” (<http://cit.ligue-cancer.net>). This work was supported by the Programme Hospitalier de Recherche

Clinique grant COMETE 3 (AOM 06 179) and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR 08 GENOPATH 029 MitOxy).

REFERENCES

- Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L. *et al.* (1993) Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, **363**, 458–460.
- Burnichon, N., Briere, J.J., Libe, R., Vescovo, L., Riviere, J., Tissier, F., Jouanno, E., Jeunemaitre, X., Benit, P., Tzagoloff, A. *et al.* (2010) SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3011–3020.
- Astuti, D., Latif, F., Dallol, A., Dahia, P.L., Douglas, F., George, E., Skoldberg, F., Husebye, E.S., Eng, C. and Maher, E.R. (2001) Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 49–54.
- Niemann, S. and Muller, U. (2000) Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat. Genet.*, **26**, 268–270.
- Baysal, B.E., Ferrell, R.E., Willett-Brozick, J.E., Lawrence, E.C., Myssiorek, D., Bosch, A., van der Mey, A., Taschner, P.E., Rubinstein, W.S., Myers, E.N. *et al.* (2000) Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*, **287**, 848–851.
- Hao, H.X., Khalimonchuk, O., Schraders, M., Dephoure, N., Bayley, J.P., Kunst, H., Devilee, P., Cremers, C.W., Schiffman, J.D., Bentz, B.G. *et al.* (2009) SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science*, **325**, 1139–1142.
- Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A.L. *et al.* (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*, **249**, 181–186.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L. *et al.* (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, **260**, 1317–1320.
- Qin, Y., Yao, L., King, E.E., Buddavarapu, K., Lenci, R.E., Chocron, E.S., Lechleiter, J.D., Sass, M., Aronin, N., Schiavi, F. *et al.* (2010) Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat. Genet.*, **42**, 229–233.
- Comino-Mendez, I., Gracia-Aznarez, F.J., Schiavi, F., Landa, I., Leandro-Garcia, L.J., Leton, R., Honrado, E., Ramos-Medina, R., Caronia, D., Pita, G. *et al.* (2011) Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat. Genet.*, **43**, 663–667.
- Amar, L., Bertherat, J., Baudin, E., Ajzenberg, C., Bressac-de Paillerets, B., Chabre, O., Chamontin, B., Delemer, B., Giraud, S., Murat, A. *et al.* (2005) Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J. Clin. Oncol.*, **23**, 8812–8818.
- Burnichon, N., Rohmer, V., Amar, L., Herman, P., Lebouilleux, S., Darrouzet, V., Niccoli, P., Gaillard, D., Chabrier, G., Chabolle, F. *et al.* (2009) The succinate dehydrogenase genetic testing in a large prospective series of patients with paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 2817–2827.
- Cascon, A., Pita, G., Burnichon, N., Landa, I., Lopez-Jimenez, E., Montero-Conde, C., Leskela, S., Leandro-Garcia, L.J., Leton, R., Rodriguez-Antona, C. *et al.* (2009) Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma in Spanish patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 1701–1705.
- Mannelli, M., Castellano, M., Schiavi, F., Filetti, S., Giacche, M., Mori, L., Pignataro, V., Bernini, G., Giache, V., Bacca, A. *et al.* (2009) Clinically guided genetic screening in a large cohort of Italian patients with pheochromocytomas and/or functional or nonfunctional paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 1541–1547.
- Eric, Z., Rybicki, L., Peczkowska, M., Golcher, H., Kann, P.H., Brauckhoff, M., Mussig, K., Muresan, M., Schaffler, A., Reisch, N. *et al.* (2009) Clinical predictors and algorithm for the genetic diagnosis of pheochromocytoma patients. *Clin. Cancer Res.*, **15**, 6378–6385.
- Iacobone, M., Schiavi, F., Bottussi, M., Taschin, E., Bobisse, S., Fassina, A., Opocher, G. and Favia, G. (2011) Is genetic screening indicated in

- apparently sporadic pheochromocytomas and paragangliomas? *Surgery*, **150**, 1194–1201.
17. Dannenberg, H., De Krijger, R.R., van der Harst, E., Abbou, M., Y, I.J., Komminoth, P. and Dinjens, W.N. (2003) Von Hippel-Lindau gene alterations in sporadic benign and malignant pheochromocytomas. *Int. J. Cancer*, **105**, 190–195.
 18. Gimm, O., Armanios, M., Dziema, H., Neumann, H.P. and Eng, C. (2000) Somatic and occult germ-line mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma. *Cancer Res.*, **60**, 6822–6825.
 19. Nakamura, E. and Kaelin, W.G. Jr. (2006) Recent insights into the molecular pathogenesis of pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr. Pathol.*, **17**, 97–106.
 20. van Nederveen, F.H., Korpershoek, E., Lenders, J.W., de Krijger, R.R. and Dinjens, W.N. (2007) Somatic SDHB mutation in an extraadrenal pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.*, **357**, 306–308.
 21. Burnichon, N., Vescovo, L., Amar, L., Libe, R., de Reynies, A., Venisse, A., Jouanno, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Bertherat, J. *et al.* (2011) Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 3974–3985.
 22. Burnichon, N., Cascon, A., Schiavi, F., Paes Morales, N., Comino-Mendez, I., Abermil, N., Inglada-Perez, L., de Cubas, A.A., Amar, L., Barontini, M.B. *et al.* (2012) MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin. Cancer Res.*, **18**, 2828–2837.
 23. Pros, E., Gomez, C., Martin, T., Fabregas, P., Serra, E. and Lazaro, C. (2008) Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Hum. Mutat.*, **29**, E173–193.
 24. Bottillo, I., Ahlquist, T., Brekke, H., Danielsen, S.A., van den Berg, E., Mertens, F., Lothe, R.A. and Dallapiccola, B. (2009) Germline and somatic NF1 mutations in sporadic and NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumours. *J. Pathol.*, **217**, 693–701.
 25. Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L. *et al.* (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, **321**, 1807–1812.
 26. Network, C.G.A.R. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, **455**, 1061–1068.
 27. Sangha, N., Wu, R., Kuick, R., Powers, S., Mu, D., Fiander, D., Yuen, K., Katabuchi, H., Tashiro, H., Fearon, E.R. *et al.* (2008) Neurofibromin 1 (NF1) defects are common in human ovarian serous carcinomas and co-occur with TP53 mutations. *Neoplasia*, **10**, 1362–1372. following 1372.
 28. Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B. *et al.* (2008) Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, **455**, 1069–1075.
 29. Holzel, M., Huang, S., Koster, J., Ora, I., Lakeman, A., Caron, H., Nijkamp, W., Xie, J., Callens, T., Asgharzadeh, S. *et al.* (2010) NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. *Cell*, **142**, 218–229.
 30. Haerlach, C., Dicker, F., Kohlmann, A., Schindela, S., Weiss, T., Kern, W., Schnittger, S. and Haerlach, T. (2010) AML with CBFB-MYH11 rearrangement demonstrate RAS pathway alterations in 92% of all cases including a high frequency of NF1 deletions. *Leukemia*, **24**, 1065–1069.
 31. Gutmann, D.H., Aylsworth, A., Carey, J.C., Korf, B., Marks, J., Pyeritz, R.E., Rubenstein, A. and Viskochil, D. (1997) The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA*, **278**, 51–57.
 32. Lee, M.J. and Stephenson, D.A. (2007) Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr. Opin. Neurol.*, **20**, 135–141.
 33. Bausch, B., Koschker, A.C., Fassnacht, M., Stoevesandt, J., Hoffmann, M.M., Eng, C., Allolio, B. and Neumann, H.P. (2006) Comprehensive mutation scanning of NF1 in apparently sporadic cases of pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 3478–3481.
 34. Powers, J.F., Evinger, M.J., Zhi, J., Picard, K.L. and Tischler, A.S. (2007) Pheochromocytomas in Nf1 knockout mice express a neural progenitor gene expression profile. *Neuroscience*, **147**, 928–937.
 35. Miller, S.J., Jessen, W.J., Mehta, T., Hardiman, A., Sites, E., Kaiser, S., Jegga, A.G., Li, H., Upadhyaya, M., Giovannini, M. *et al.* (2009) Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. *EMBO Mol. Med.*, **1**, 236–248.
 36. Korpershoek, E., Favier, J., Gaal, J., Burnichon, N., van Gessel, B., Oudijk, L., Badoual, C., Gadessaud, N., Venisse, A., Bayley, J.P. *et al.* (2011) SDHA immunohistochemistry detects germline SDHA gene mutations in apparently sporadic paragangliomas and pheochromocytomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**, E1472–1476.
 37. van Nederveen, F.H., Gaal, J., Favier, J., Korpershoek, E., Oldenburg, R.A., de Bruyn, E.M., Sleddens, H.F., Derkx, P., Riviere, J., Dannenberg, H. *et al.* (2009) An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol.*, **10**, 764–771.
 38. Plouin, P.F. and Gimenez-Roqueplo, A.P. (2006) Initial work-up and long-term follow-up in patients with pheochromocytomas and paragangliomas. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **20**, 421–434.
 39. Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.*, **3**, Article3.
 40. Huang da, W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, **4**, 44–57.
 41. Peiffer, D.A., Le, J.M., Steemers, F.J., Chang, W., Jenniges, T., Garcia, F., Haden, K., Li, J., Shaw, C.A., Belmont, J. *et al.* (2006) High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res.*, **16**, 1136–1148.
 42. Staaf, J., Vallon-Christersson, J., Lindgren, D., Juliusson, G., Rosenquist, R., Hoglund, M., Borg, A. and Ringner, M. (2008) Normalization of Illumina Infinium whole-genome SNP data improves copy number estimates and allelic intensity ratios. *BMC Bioinformatics*, **9**, 409.
 43. Letouze, E., Sow, A., Petel, F., Rosati, R., Figueiredo, B.C., Burnichon, N., Gimenez-Roqueplo, A.P., Lalli, E. and de Reynies, A. (2012) Identity by descent mapping of founder mutations in cancer using high-resolution tumor SNP data. *PLoS One*, **7**, e35897.
 44. Popova, T., Manie, E., Stoppa-Lyonnet, D., Rigai, G., Barillot, E. and Stern, M.H. (2009) Genome Alteration Print (GAP): a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by SNP arrays. *Genome Biol.*, **10**, R128.
 45. Edgar, R., Domrachev, M. and Lash, A.E. (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 207–210.
 46. Pasmant, E., Sabbagh, A., Masliah-Planchon, J., Ortonne, N., Laurendeau, I., Melin, L., Ferkal, S., Hernandez, L., Leroy, K., Valeyrie-Allanore, L. *et al.* (2011) Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *J. Natl Cancer Inst.*, **103**, 1713–1722.
 47. Ars, E., Kruyer, H., Morell, M., Pros, E., Serra, E., Ravella, A., Estivill, X. and Lazaro, C. (2003) Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. *J. Med. Genet.*, **40**, e82.
 48. Gasparini, P., D'Agruma, L., Pio de Cillis, G., Balestrazzi, P., Mingarelli, R. and Zelante, L. (1996) Scanning the first part of the neurofibromatosis type 1 gene by RNA-SSCP: identification of three novel mutations and of two new polymorphisms. *Hum. Genet.*, **97**, 492–495.
 49. Fahsold, R., Hoffmeyer, S., Mischung, C., Gille, C., Ehlers, C., Kucukcylan, N., Abdel-Nour, M., Gewies, A., Peters, H., Kaufmann, D. *et al.* (2000) Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 790–818.
 50. Xu, G.F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R. *et al.* (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*, **62**, 599–608.

LEGENDS TO SUPPLEMENTAL TABLES AND SUPPLEMENTAL FIGURES

Supplementary Material, Table S1: Genetic features of the 78 pheochromocytomas/paragangliomas comprised in the *RET/NF1/TMEM127*-related tumor cluster (C2A).

Supplementary Material, Table S2: List of probes significantly deregulated in *NF1*-mutated tumors (FDR-adjusted p-value < 0.05).

(S2a) Probes significantly overexpressed in *NF1*-mutated tumors (FDR-adjusted p-value < 0.05); (S2b) Probes significantly underexpressed in *NF1*-mutated tumors (FDR-adjusted p-value < 0.05). Probes are sorted by expression difference.

Supplementary Material, Table S3: Somatic events in the *NF1* gene identified in a second set of 11 pheochromocytomas/paragangliomas with low *NF1* mRNA expression. LOH, Loss Of Heterozygosity; g: germline mutation, s: somatic mutation, NM: non-mutated.

^{\$}The GTPase-activating protein-Related Domain (GRD) central domain of the protein is coded by exons 20 to 27a (50). Any truncating mutation in this domain will affect the GAP function of the protein. Upstream this GRD-domain, a cysteine serine rich domain (CSRD) coded by exons 11 to 17 has been described (47). However, its role remains unknown. Truncating mutations identified downstream of the GRD-domain will affect the COOH terminal part (COOH-term) of the protein inside of which domains are not clearly identified. This COOH part of neurofibromin contains several potential phosphorylation sites.

Supplementary Material, Table S4: Neurofibromin and Sox9 immunohistochemistry data.

g: germline mutation, s: somatic mutation, NM: non-mutated.

Supplementary Material, Figure S1: Evaluation of neurofibromin and Sox9 protein expression by immunohistochemistry.

18 samples were tested for (A) neurofibromin and (B) Sox9 immunohistochemistry. Tumours were classified according to the level of expression of the protein, which was either absent (left panel), very low (middle panel), or high (right panel). Calibration bar 50 μ m.

Supplementary Material, Figure S2: Chromosome aberrations affecting *NF1* identified by SNP array analysis.

Log R ratio (LRR) and B Allele Frequency (BAF) profiles along chromosome 17 are represented for 3 tumor samples. (A) Loss of heterozygosity (LOH) affecting the whole chromosome 17 (patient #002). (B) Focal LOH spanning 500 Kb around *NF1* (patient #187). (C) Large LOH and homozygous deletion of *NF1* gene (patient #053). Yellow: no copy number alteration; green: loss; blue: homozygous deletion; light blue (BAF plots): LOH; black (BAF plots): heterozygosity.

Supplementary Material, Figure S3: Chromosome aberrations in the 78 tumors belonging to Cluster 2A.

For each mutational group (*NF1*-mutated, *RET*-mutated, and tumors without mutation), the frequencies of gains (in red), deletions (in green) and LOH (in blue) along the genome are represented on the left. The results of association tests assessing

the enrichment of gains/deletions/LOH in the mutational group compared with the two other groups are represented on the right (log-transformed, FDR-adjusted p-values).

Gene	<i>MAX</i>	<i>NF1</i>	<i>RET</i>	<i>TMEM127</i>	Total
Germline mutation	0	9	8	1	18
Somatic mutation	1	Present study	6	0	7
No mutation					53

Supplementary Material, Table S1: Genetic features of the 78 pheochromocytomas/paragangliomas comprised in the *RET/NF1/TMEM127*-related tumor cluster (C2A).

Patient ID	mRNA level of NF1 expression	Mutation type	LOH at the NF1 locus	NF1 somatic mutations (nucleotide)	NF1 somatic mutations (protein)	Likely consequence on the protein function ^s
018	151.7	VHLs (p.Val166Phe)	Yes	c.289 888del	p.Gln97 Lys296del	Unknown
046	174.2	VHLs (p.Val166Phe)	Yes			
113	90.5	NM	Yes			
157	122.8	VHLg (p.Arg161Gln)	Yes			
176	154.5	NM	Yes			
179	239.2	NM	Yes			
189	46.2	VHLs (p.Lys159Glu)	Yes			
192	51.2	RETs (p.Met918Thr)	No	c.4860delG	p.Ala1534GlufsX19	Loss of GRD-domain
194	127.0	NM	No			
200	191.5	SDHB (p.Pro56Tyrfs*5)	Yes			
204	180.8	VHLg (p.Arg167Gln)	Yes			

Supplementary Material, Table S3: Somatic events in the *NF1* gene identified in a second set of 11 pheochromocytomas/paragangliomas with low *NF1* mRNA expression.

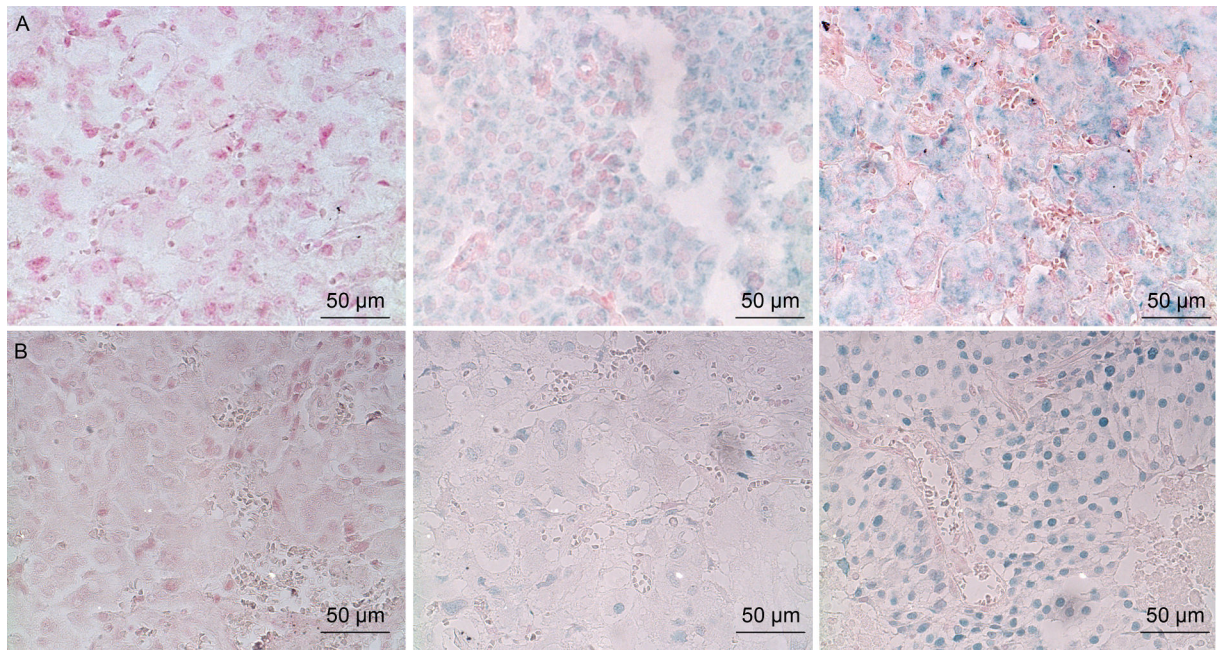
LOH, Loss Of Heterozygosity; g: germline mutation, s: somatic mutation, NM: non-mutated.

^sThe GTPase-activating protein-Related Domain (GRD) central domain of the protein is coded by exons 20 to 27a (50). Any truncating mutation in this domain will affect the GAP function of the protein. Upstream this GRD-domain, a cysteine serine rich domain (CSRD) coded by exons 11 to 17 has been described (47). However, its role remains unknown. Truncating mutations identified downstream of the GRD-domain will affect the COOH terminal part (COOH-term) of the protein inside of which domains are not clearly identified. This COOH part of neurofibromin contains several potential phosphorylation sites.

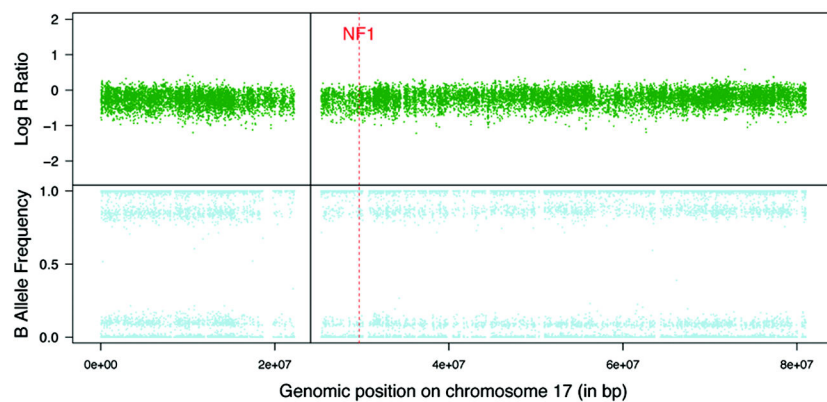
Patient Id	Mutation type	LOH 17q11.2	mRNA level of NF1 expression	NF1 IHC result	mRNA level of SOX9 expression	Sox9 IHC result
003	NF1s	yes	46.8	1	539.0	2
013	NM	no	42.25	0	278.8	2
016	NF1g	yes	43.7	1	148.8	0
020	NM	no	35.6	1	1297.5	2
033	NF1s	yes	52.2	1	1092.0	2
044	RETg	yes	207.9	1	13.9	0
045	NF1s	yes	43.3	0	307.3	1
053	NF1s	yes	149.4	2	412.0	2
061	NF1s	yes	95.8	2	41.2	0
072	NF1s	yes	93.1	2	198.0	0
080	NF1g	no	375.8	2	151.1	1
086	NF1g	yes	NA	0	NA	1
112	VHLg	no	259.85	0	16.5	0
113	NM	yes	90.5	2	244.4	0
115	NF1g	no	46.9	2	520.2	2
120	NF1s	yes	57.0	1	542.2	1
133	RETg	no	258.98	0	14.9	0
208	SDHBg	gain	348.92	0	44.1	1

Supplementary Material, Table S4: Neurofibromin and Sox9 immunohistochemistry data.

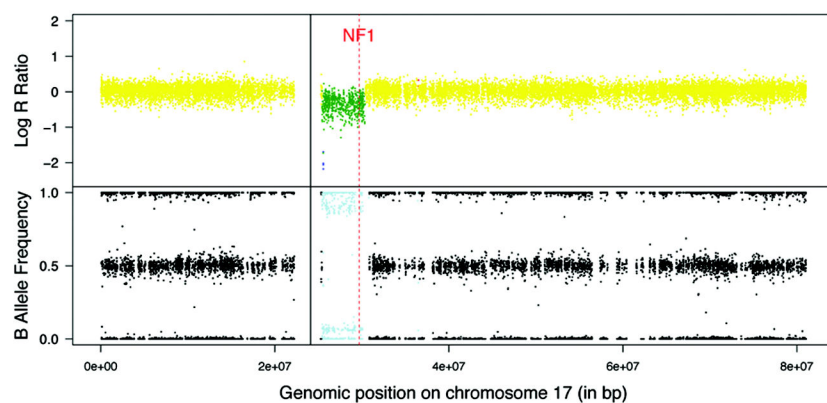
g: germline mutation, s: somatic mutation, NM: non-mutated, ND: not done, NA: not available



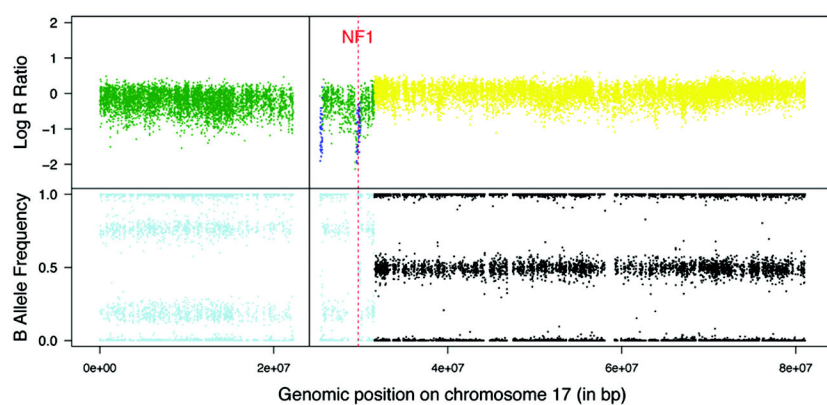
A



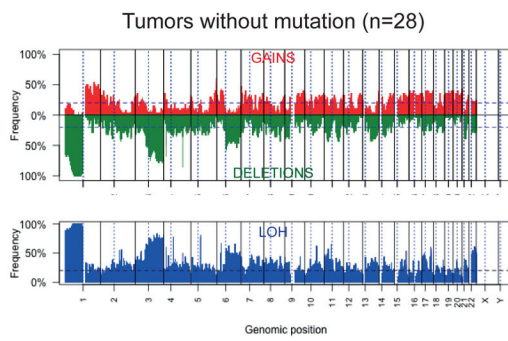
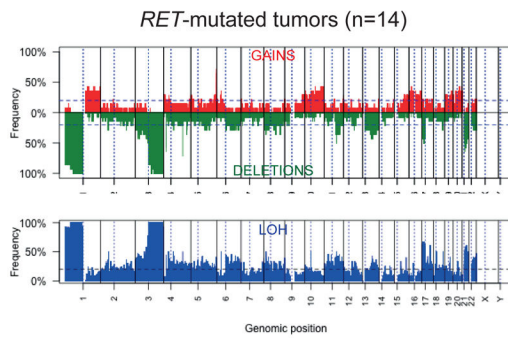
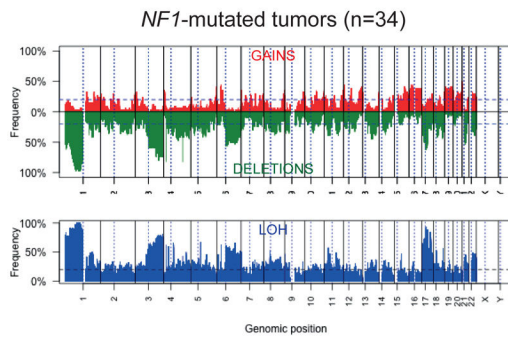
B



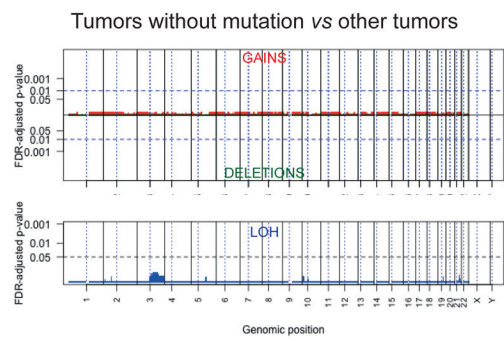
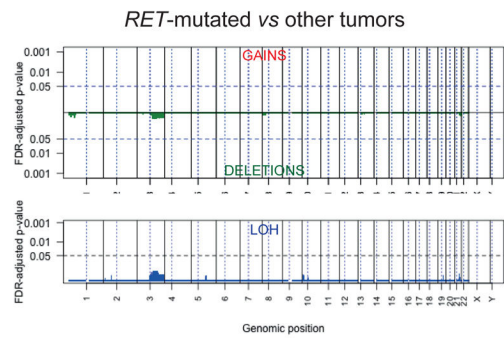
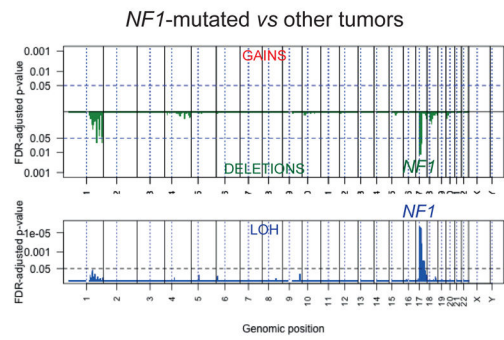
C



ABERRATION FREQUENCY



ASSOCIATION TEST



II. L'HYPERMÉTHYLATION DE MGMT DANS LES TUMEURS SDHB EST UN FACTEUR PRÉDICTIF DE BONNE RÉPONSE THÉRAPEUTIQUE AU TÉMOZOLOMIDE DANS LES PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES MÉTASTATIQUES

Hadoux J, et al.

“SDHB mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma and paraganglioma”

Int J Cancer. 2014

SDHB mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or paraganglioma

Julien Hadoux¹, Judith Favier^{2,3}, Jean-Yves Scoazec⁴, Sophie Leboulleux¹, Abir Al Ghuzlan⁴, Caroline Caramella⁵, Désirée Déandreis¹, Isabelle Borget⁶, Céline Lorient^{2,3}, Cécile Chougnet¹, Eric Letouze⁷, Jacques Young⁸, Laurence Amar⁹, Jérôme Bertherat¹⁰, Rosella Libé¹¹, Frédéric Dumont¹², Frédéric Deschamps¹³, Martin Schlumberger¹, Anne Paule Gimenez-Roqueplo^{2,3,14} and Eric Baudin¹

¹ Department of Nuclear Medicine and Endocrine Tumors, Gustave Roussy, University Paris-Sud, F-94800 Villejuif, France

² INSERM, UMR970, Paris Cardiovascular Research Center, F-75015 Paris, France

³ Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France

⁴ Department of Pathology, Gustave Roussy, F-94800 Villejuif, France

⁵ Department of Radiology, Gustave Roussy, F-94800 Villejuif, France

⁶ Department of Biostatistics and Epidemiology, Gustave Roussy, F-94800 Villejuif, France

⁷ Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre Le Cancer, F-75013 Paris, France

⁸ Department of Endocrinology, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

⁹ Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Hypertension Unit, F-75015 Paris, France

¹⁰ Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France

¹¹ Institut National du Cancer, French Adrenal Cancer Network, F-75014 Paris, France

¹² Department of Oncologic Surgery, Gustave Roussy, F-94800 Villejuif, France

¹³ Department of Interventional Radiology, Gustave Roussy, F-94800 Villejuif, France

¹⁴ Department of Genetics, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, F-75015 Paris, France

Cyclophosphamide–dacarbazine–vincristine regimen is recommended for the treatment of malignant pheochromocytoma and paraganglioma (MPP); however, dacarbazine is the only recognized active drug in neuroendocrine tumours. We investigated the therapeutic benefit of temozolomide (TMZ), an oral alternative to dacarbazine, in patients with MPP. This is a retrospective study of consecutive patients with documented progressive MPP. We examined the correlation between *Succinate dehydrogenase B (SDHB)* mutation and *O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)* promoter methylation and MGMT expression in the French nation-wide independent cohort of 190 pheochromocytomas or paragangliomas (PP). Progression-free survival (PFS) according to RECIST 1.1 and PERCIST 1.0 criteria was the primary end point. Fifteen consecutive patients with MPP were enrolled; ten (67%) carried a mutation in *SDHB*. The mean dose intensity of TMZ was 172 mg/m²/d for 5 days every 28 days. Median PFS was 13.3 months after a median follow-up of 35 months. There were five partial responses (33%), seven stable (47%) and three progressive diseases (20%). Grade 3 toxicities were lymphopenia in two patients and hypertension in one. Partial responses were observed only in patients with mutation in *SDHB*. MGMT immunohistochemistry was negative in tumour samples from four patients who responded to treatment. *SDHB* germline mutation was associated with hypermethylation of the *MGMT* promoter and low expression of *MGMT* in 190 samples of the French nation-wide independent cohort. This study demonstrates that TMZ is an effective antitumour agent in patients with *SDHB*-related MPP. The silencing of *MGMT* expression as a consequence of *MGMT* promoter hypermethylation in *SDHB*-mutated tumours may explain this finding.

Key words: malignant pheochromocytoma, paraganglioma, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), succinate dehydrogenase B (SDHB), temozolomide

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Malignant pheochromocytoma and paraganglioma (PP) are frequently associated with mutations in *succinate dehydrogenase B (SDHB)*. We found a correlation between mutations in *SDHB* and hypermethylation of the promoter of *O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)* in tumour samples from a French cohort of 190 patients with PP. Temozolomide yielded a clinical benefit in 67% of 15 patients treated for progressive malignant PP. The expression of *MGMT* was deficient in tumour samples from four of the five patients who responded to treatment. These results suggest that a personalized therapeutic approach may be applicable to this rare cancer.

Grant sponsor: Programme Hospitalier de Recherche Clinique grant COMETE 3; **Grant number:** AOM 06 179; **Grant sponsor:** Agence Nationale de la Recherche; **Grant number:** ANR 11 JSV1 007 01 MODEOMAPP

DOI: 10.1002/ijc.28913

History: Received 6 Dec 2013; Accepted 2 Apr 2014; Online 18 Apr 2014

Correspondence to: Dr. Eric Baudin, Department of Nuclear Medicine and Endocrine Tumors, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex, France, Tel.: 0033(0)142114242, Fax: 0033(0)0142116363, E-mail: eric.baudin@gustaveroussy.fr

What's new?

Malignant pheochromocytoma and paraganglioma (MPP) are frequently associated with mutations in *succinate dehydrogenase B (SDHB)* gene. In this study of MPP, the authors found a correlation between *SDHB* mutations in MPP and hypermethylation of the promoter of *O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)* gene. Hypermethylation and decreased expression of *MGMT* have been associated with a positive response to the drug temozolomide (TMZ). When the authors tested TMZ in MPP patients, 67% experienced clinical benefit, and 80% of responders had tumors with low levels of *MGMT*. These results suggest that a personalized therapeutic approach may be applicable to this rare cancer.

Pheochromocytomas and paragangliomas (PP) are rare neuroendocrine tumours. Pheochromocytomas arise from chromaffin cells of the adrenal medulla and paragangliomas arise from paraganglia of the sympathetic or parasympathetic nervous system.¹ PP are often characterized by the secretion of catecholamines, which may result in comorbid hormone-related symptoms. A high percentage of these tumours are inherited (>35%)^{2,3} and mutations in 12 genes have been associated with predisposition to PP. Among them, *SDHB* is associated with malignancy and poor prognosis.⁴ Malignant pheochromocytomas and paragangliomas (MPP) are characterized by metastases at sites where chromaffin cells are normally absent. MPP represents between 14 and 17% of PP.^{5,6} MPP are characterized by their heterogeneous natural history and by a high frequency of bone metastases.^{3,7}

In the absence of a cure, the main goals of MPP treatment are to control hormone-related symptoms and tumour burden.⁸ Systemic therapy including MIBG (Meta-Iodo-Benzyl-Guanidine) therapy or chemotherapy are recommended for patients with progressive disease or large tumour burden, and also for other symptomatic patients.⁸ In the absence of Phase II or III clinical trials, chemotherapy with a regimen of cyclophosphamide–vincristine–dacarbazine (CVD) is recommended on the basis of the results of four retrospective case series.^{9–13} In the first of these reports by Averbuch *et al.*,⁹ which was updated in 2008,¹¹ the CVD regimen resulted in partial or complete response in 55% of patients from a cohort of 18. Patel *et al.*¹² reported a similar partial response rate of 46% in 13 patients with MPP. In this study, patients received a modified CVD regimen that was combined with doxorubicin and included the optional use of vincristine. The MD Anderson Cancer Centre group reported that the use of the CV regimen and the optional use of vincristine or doxorubicin was associated with a 25% objective response rate in 52 patients with MPP.¹⁰ In a recent report from Japan, complete or partial biochemical and/or tumour responses were achieved in 47.1 % of 17 patients who had received CVD during a 23 year period.¹³ Anecdotal reports suggest that the efficacy of chemotherapy may be high in patients with mutations in *SDHB*.^{14,15} However, the use of CVD polychemotherapy in patients with MPP has not been validated by any prospective study. In addition, the efficacy of either vincristine or cyclophosphamide as a single agent to treat patients

with MPP has not been validated. These drugs should be used with caution because they may cause constipation or cardiac dysfunction, which are frequent comorbidities associated with MPP.

We hypothesized that dacarbazine is the only active anti-tumour agent in the CVD regimen. Indeed, dacarbazine is active against digestive and thoracic neuroendocrine tumours (NET).¹⁶ Temozolomide (TMZ) as a monotherapy was effective in a patient with MPP¹⁷ and TMZ in combination with thalidomide was effective in one of three patients in a Phase II trial.¹⁸ TMZ is a 3-methyl analogue of mitozolomide which was developed as an orally administered alternative to intravenous dacarbazine¹⁹ and has shown antitumour activity similar to dacarbazine in the treatment of melanoma.²⁰ The efficacy of TMZ for the treatment of glioblastoma and neuroendocrine tumours is correlated with the expression of *O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)* and/or *MGMT* promoter methylation.^{21,22}

To investigate further the efficacy of TMZ, we retrospectively analysed consecutive patients with MPP treated with TMZ at Gustave Roussy. We also examined the relationship between *SDHB* mutation, *MGMT* expression, and TMZ efficacy.

Methods**Population**

Patients with MPP who were referred to Gustave Roussy between November 2007 and September 2011 were considered for treatment with TMZ. TMZ treatment was initiated if the following criteria were fulfilled: (i) the pathological diagnosis of MPP was reviewed and confirmed at our institution; (ii) MPP was defined as progressive according to assessment by RECIST 1.1²³ criteria and PERCIST 1.0²⁴ criteria made within the past year; (iii) WHO performance status was between 0 and 2; (iv) estimated life expectancy was longer than 6 months; (v) At least 4 weeks had elapsed since previous treatment was stopped. Exclusion criteria were (i) cardiovascular conditions such as uncontrolled hypertension, congestive heart failure or unstable coronary disease; (ii) haematopoietic abnormalities: absolute neutrophil count <1,500 cells/mm³ or thrombopenia <100,000 cells/mm³; (iii) hepatic impairment: bilirubin >2 × upper limit of normal (ULN) or alanine aminotransferase/aspartate aminotransferase activity

$>5 \times \text{ULN}$; (iv) renal insufficiency defined by a glomerular filtration rate $<60 \text{ ml/min}$ and (v) Concomitant administration of other chemotherapy. Genetic testing to screen for mutations in PP predisposing genes (*SDHB*, *SDHD*, *SDHC*, *SDHA*, *VHL*, *NF1*, *RET*, *TMEM127* and *MAX*) was carried out on genomic DNA at the Laboratory of Genetics of Hôpital Européen Georges Pompidou as previously described.²⁵ The following clinical characteristics were recorded: delay since diagnosis (first evidence of disease), delay since first surgery, delay since first metastasis, age, sex, WHO performance status, weight, hormone- or tumour-related symptoms, chromogranin A serum concentrations,^{26,27} urinary concentrations of metanephrines including: metanephrine, normetanephrine and methoxytyramine,²⁸ ¹³¹I-MIBG scintigraphy, somatostatin receptor scintigraphy or FDG-PET status,²⁹ primary location, metastatic locations based on lung and abdomen-pelvic CT, and/or liver and bone MRI.^{30,31} Patients with hormone-related symptoms were defined as functional MPP patients. This study was approved by our local ethics committee.

Study design

TMZ was given orally at an initial daily dose of 150 mg/m^2 per day for 5 days, every 28 days. In patients with a good tolerance during the first cycle, the TMZ dose was increased to 200 mg/m^2 per day for 5 days, every 28 days. The primary objective was to determine progression-free survival (PFS) according to an assessment using RECIST 1.1 or PERCIST 1.0 criteria that was performed every 3 months. Secondary objectives included the objective response rate as assessed by RECIST 1.1 or PERCIST 1.0, the duration of response, safety, and overall survival. If there was a discrepancy between RECIST/PERCIST scores, then the RECIST 1.1 result was taken into account to determine the response rate.

TMZ was administered until disease progression, unacceptable toxicity or stabilization of best response was confirmed by two consecutive imaging examinations. Exploratory analyses were scheduled to look for prognostic markers of clinical benefit, which was defined as a partial response or a prolonged stabilization longer than 6 months. TMZ dosing was adapted as follows. TMZ dose was reduced if Grade 4 haematologic toxicity was encountered during treatment cycles. TMZ dose was also reduced if treatment was delayed due to a low neutrophil count $<1,000 \text{ cells}/\mu\text{l}$ or a low platelet count $<100,000 \text{ cells}/\mu\text{l}$ at Day 1 of the subsequent cycle. Granulocyte colony-stimulating factor was allowed in case of neutropenia and erythropoietin stimulating agent was allowed in case of anaemia.

TMZ dose was also reduced if any Grade 3 nonhaematologic toxicities were encountered (except for alopecia and nausea).

Two dose reductions were allowed: if the dose was 200 mg/m^2 then it was reduced to 150 mg/m^2 and then to 100 mg/m^2 per day for 5 days of every 28 days cycle. TMZ was stopped if persistent Grade ≥ 3 neutropenia or thrombocytopenia did not resolve within 21 days, despite the adjustment in dose. This

also applied to any recurrent Grade 3 nonhaematologic adverse events and to any Grade 4 nonhaematologic toxicity.

Efficacy and safety assessment

Safety was assessed throughout the study by monitoring and recording adverse events, vital signs, clinical chemistry, and haematology. Adverse events were graded according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (nci-ctc, v.4).

Evaluation of tumour response was performed according to in-house assessment using RECIST 1.1 criteria (CC). Computed tomography (CT) and/or magnetic resonance imaging (MRI) scans were performed at the time of initial screening and every 12 weeks. In non-RECIST 1.1-evaluable patients, determination of objective response was performed in-house according to PERCIST 1.0 criteria (DD). FDG-PET was performed at the time of initial screening and every 12 weeks.

Measurement of tumour markers

Serum concentrations of Chromogranin A (CgA; CGA-RIACT, Cis bio international, Gif sur Yvette, France, normal range: $0\text{--}140 \text{ ng/ml}$) were measured at baseline and then every 12 weeks. Baseline CgA was considered as elevated if it was ≥ 2 times the upper normal limit ($2 \times \text{ULN}$). Total methoxylated derivatives (metanephrine, normal value $15\text{--}120 \text{ nmol/mmol creatinine}$; normetanephrine, normal value $40\text{--}275 \text{ nmol/mmol creatinine}$; methoxytyramine, normal value $20\text{--}190 \text{ nmol/mmol creatinine}$) were extracted from 24-hr urine samples. All extracts were analysed by high performance liquid chromatography using a reverse phase column and amperometric detection. Total urinary methoxylated derivatives were measured at baseline and every 12 weeks. Baseline urinary methoxylated derivatives were considered as elevated if metanephrine, normetanephrine and/or methoxytyramine were $>\text{ULN}$.

A relationship between CgA response, which was defined as a CgA concentration more than 50% lower than the baseline value, and tumour response or clinical benefit was also investigated.

O6-methylguanine–DNA methyltransferase (MGMT) expression

MGMT expression was assessed by immunohistochemistry (IHC) (see Supporting Information methods). The results were analysed by four independent investigators, two pathologists from the Pathology department of Gustave Roussy (AAG and JYS) and two researchers from INSERM U970 (JF and CL). Scoring was performed independently and the pathologists (AAG and JYS) were blind to the *SDHB* mutation status. Stromal cells (endothelial cells, fibroblasts) and sustentacular cells were used as internal positive controls. Only nuclear staining was considered significant. MGMT expression was previously scored as either “intact” or “deficient.”²² As underlined by Kulke *et al.*²² and by Ekeblad *et al.*,³² in gastroenteropancreatic NET the number of positive tumour

cells is variable from one case to another and the distribution of positive cells over the whole tissue section may be highly heterogeneous. In keeping with these studies, we considered tumours with a low percentage of positive cells or tumours with a highly heterogeneous distribution of positive tumour cells as “MGMT deficient.” We selected a 20%-cutoff to distinguish between MGMT-intact and MGMT-deficient tumours. MGMT-intact tumours were defined by the presence of more than 20% positive tumour cells. MGMT-deficient tumours were defined by the complete absence of positive tumour cells or by the presence of less than 20% positive cells distributed over the whole tumour tissue section.

MGMT methylation analysis in the study group and in an independent cohort of PP

MGMT promoter methylation was assessed from paraffin-embedded tumour samples of the patients recruited in the study by two techniques: methyl-specific PCR after bisulphite treatment of DNA, performed with two different kits (Epitect bisulfite kit, Qiagen, Courtaboeuf, France and Bisulflash DNA modification kit, Epigentek, Farmingdale, NY) and pyrosequencing (Pyromark MGMT kit, Qiagen). Paraffin-embedded glioma tissue samples were used as controls for DNA extraction and MGMT promoter analysis.

We examined MGMT expression and methylation levels in an independent cohort of 190 PPs, collected by the French COMETE network (Supporting Information Table 2). Among them, 17 patients harboured a germ line *SDHB* mutation (five with benign and 12 with malignant tumours). Thirteen additional patients were affected with metastatic disease [six with sporadic tumours, and seven with either germ line or somatic mutations in *FH* ($n = 1$), *NF1* ($n = 1$) or *VHL* ($n = 5$)]. Gene expression was analysed using HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix GeneChip arrays (ArrayExpress entry E-MTAB-733) and data for these 190 samples were available from a previous study.³³ DNA methylation was analysed in these samples using the Illumina Infinium Human Methylation assay³⁴ performed by Integragen SA (Evry, France, <http://www.integragen.com>) according to the manufacturer's instructions. Methylation level at each CpG site was scored as beta values ranging from 0 to 1, with values close to 0 indicating low levels of DNA methylation, and values close to 1 indicating high levels of DNA methylation. Beta-values for MGMT CpGs in the 190 samples are provided in Supporting Information Table 2.

Statistical analysis

Descriptive quantitative data were expressed as mean \pm standard deviation and qualitative data were expressed as a percentage. Median follow-up, overall survival (OS) and PFS were estimated by the Kaplan–Meier method. PFS was defined by the time elapsed between the first dose of TMZ and either progression or death by any cause, and OS was defined by the time elapsed between the first dose of TMZ

Table 1. Patient characteristics

Characteristics	Patients (N = 15)	
	N	%
Median age	42.6 years	(range 26–81 years)
Sex		
Male	12	80
Female	3	20
Genetic status		
No mutation	5	33
<i>SDHB</i> mutation	10	67
Primary site		
Adrenal	8	53
Thorax	6	40
Neck	1	7
Functional tumour	11	73
Chromogranin A ≥ 2 UNL	10	67
Median time between diagnosis and metastatic disease (months)	45.8	(range: 0–600)
Locoregional recurrence	3	20
Metastatic sites		
Bone	12	80
Lymph nodes	11	73
Liver	6	40
Lung	5	33
Number of previous systemic therapies¹		
0	7	46.7
1	2	13.3
2	6	40
Previous local therapeutic options		
Surgery of the primary tumour	14	93.3
Radiation therapy	10	66.7
Surgery of metastases	3	20
Bone radiofrequency ablation	4	26.7

¹Prior therapies included: interferon alpha therapy, I-131 MIBG therapy and sunitinib treatment.

and death by any cause. Data were censored at last follow-up for patients without progression or death. Log rank test was used for survival curve comparisons.

A relationship between “decreased” CgA, which was defined as a CgA concentration more than 50% lower than the baseline value, and tumour response or clinical benefit was investigated, as described previously.³⁵ We also looked for a relationship between deficient MGMT expression (as assessed by immunohistochemistry) and tumour response or clinical benefit.

In the cohort of 190 patients with PP, differential MGMT expression between *SDHB*-related and non *SDHB*-related tumours was analysed using Student's *t*-test, and Wilcoxon

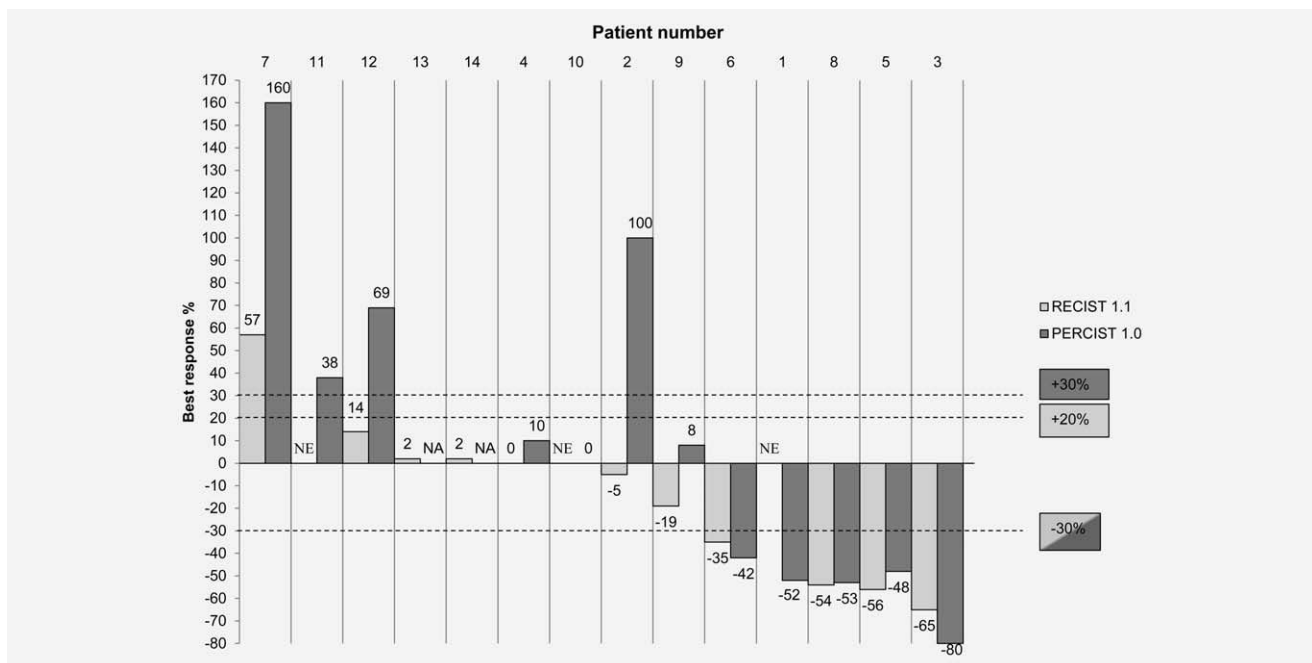


Figure 1. Waterfall plot. RECIST 1.1 and PERCIST 1.0 evaluation of 14 evaluable patients. NA: FDG-PET not available; NE: not evaluable (bone metastases, only); LD: longest diameters; SUL: standard uptake value standardized to lean body mass. Best response stands for: RECIST, percentage of variation in the sum of longest diameters of measurable lesions; PERCIST, percentage of variation in the SUL peak of the target lesions on FDG-PET. Due to a new site of FDG uptake in Patient 2 while on treatment, we arbitrarily assigned a 100% increase in SULpeak for this patient.

rank-sum tests were used to detect differentially methylated CpGs. Correlation between methylation beta values and *MGMT* expression was assessed based on Pearson's product moment correlation coefficient. All statistical analyses were carried out using R software version 2.15 (<http://www.R-project.org>).

Results

Patients

Fifteen patients with MPP were enrolled in this study: 12 males and three females with a median age of 42 years (Table 1). MPP were functional in 11 (73%) patients and an *SDHB* germ line mutation was identified in 10 patients (66.7%). No other mutation was found. The primary tumour was located in the adrenal medulla in eight cases (53%). Ten patients had a high baseline serum concentration of CgA. Urinary concentrations of metanephrines, normetanephrines, and methoxytyramines at baseline were available for 11 patients and were elevated in eight of them. The most frequent metastatic location was the bone in 12 patients (80%), and this was the only metastatic site in three patients. The time between the diagnosis of PP and the discovery of metastatic disease ranged from 2 months to 50 years. All patients received TMZ as a first-line cytotoxic chemotherapy. MIBG therapy was given to one patient prior to TMZ therapy and to four patients after TMZ therapy.

Tumour responses and survival analysis

One patient died before the first imaging evaluation due to tumour progression. The response of tumours to treatment

was thus evaluated using RECIST 1.1 or PERCIST 1.0 criteria in 14 of the 15 patients (Figure 1 and Table 3). Tumour response could be evaluated according to RECIST 1.1 in eleven patients. Four patients (36%) experienced a partial response (PR), six patients (55%) had a stable disease (SD) and one patient (9%) had a progressive disease (PD). In the three cases in which tumour response could not be evaluated with RECIST 1.1, evaluation according to PERCIST 1.0 criteria demonstrated one partial metabolic response, one stable metabolic disease, and one progressive metabolic disease. Thus, if we combine RECIST 1.1 and PERCIST 1.0 evaluations, there were five (33%) PR, seven (47%) SD, and three (20%) PD (including the patient who died during the first cycle). A clinical benefit (PR + SD \geq 6 months) was therefore observed in 10 of the 15 patients (67%).

After a median follow up of 35 months, the median PFS was 13.3 months. PFS was significantly longer in patients with a germ line *SDHB* mutation (19.7 months) than in patients without mutation [2.9 months; HR=0.16 (IC 95 0.04–0.72), $p = 0.007$; Figure 2]. Three-year OS was 55%, with no statistical difference between patients with *SDHB* mutations and patients without *SDHB* mutations ($p = 0.17$).

Temozolomide therapy safety

A median number of seven cycles of TMZ (range 1–28) was administered. Mean dose intensity was 172 mg/m² per day for 5 days of every 28 day cycle. At the time of data cutoff, four patients were still participating in follow-up and were stable several months after the withdrawal of TMZ (6, 22, 23

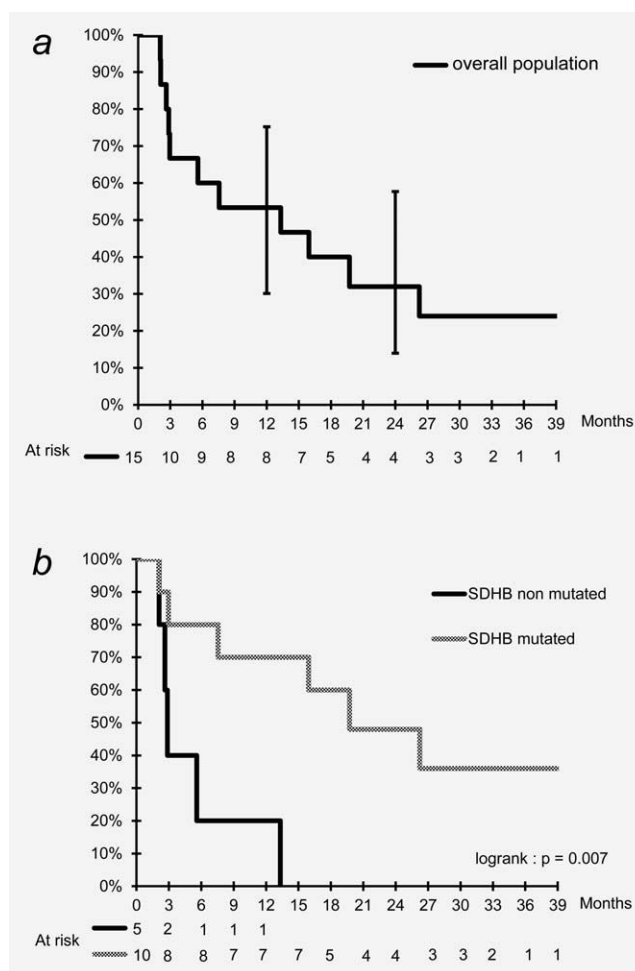


Figure 2. PFS for overall population and PFS according to *SDHB* mutation status. Kaplan–Meier curve of progression free survival for overall population (a). Kaplan–Meier curve of progression free survival for patients with mutation in *SDHB* and patients without mutation in *SDHB* (b).

or 28 months). Safety data are summarized in Table 2. TMZ was generally well tolerated and no unexpected toxicity was observed: three patients experienced Grade 3 toxicities, including lymphopenia in two patients and Grade 3 hypertension in one patient. No opportunistic infection was diagnosed. The main Grade 1 or 2 toxicities were digestive problems (53%), anaemia (47%), asthenia (47%) and constipation (20%). No life-threatening adverse event occurred.

Chromogranin A and metanephrine measurements

Serum concentrations of chromogranin A were assessed as a biomarker of the response to treatment (Table 3 and Supporting Information Figure 1). Five of the ten patients with a high CgA concentration at baseline experienced a CgA response. Among these five patients, three had a partial response and two had a stable disease for more than 6 months according to both RECIST 1.1 and PERCIST 1.0 criteria. Serum concentrations of CgA were found to be within the normal range following treatment in the three patients who showed a partial response. Eight patients had elevated baseline urinary concentrations of metanephrines. Following treatment, two of the eight patients normalized their concentration of metanephrines. Both experienced a partial response (Table 3).

Evaluation of MGMT expression and methylation status

MGMT expression and/or promoter methylation is associated with response to TMZ in patients with glioblastoma. We thus carried out *MGMT* expression analysis using ten available paraffin-embedded tumour samples. *MGMT* was classified “deficient” in five patients, all of whom carried a germ line *SDHB* mutation (Table 3). Four of these patients responded to treatment and one had had stable disease for 8 months. Inter-observer variability could not be measured due to the small sample size. Despite several attempts at DNA

Table 2. Adverse events

Event	Patient by event grade					
	Total		Grade 1–2 ¹		Grade 3–4 ¹	
	No.	%	No.	%	No.	%
Nausea and vomiting	8	53.3	8	53.3	0	0
Mucositis	2	13.3	2	13.3	0	0
Anemia	7	46.7	7	46.7	0	0
Leucopenia	1	6.7	1	6.7	0	0
Lymphopenia	3	20	1	6.7	2	13.3
Thrombopenia	2	13.3	2	13.3	0	0
Asthenia	7	46.7	7	46.7	0	0
Constipation	3	20	3	20	0	0
Others ²	5	33.3	4	26.7	1	6.7

¹Graded according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (nci.ctc, v.4).

²Other toxicity = hypertension G3 ($n = 1$), acne G1 ($n = 1$), insomnia G2 ($n = 1$), dysuria G2 ($n = 1$) and anorexia G2 ($n = 1$).

Table 3. MGMT expression, CgA and metanephrine response and morphologic or metabolic response

Patient number	SDHB mutation	MGMT expression	Baseline CgA > 2 ULN	CgA response	Baseline urinary metanephrine/creatinin elevation (>ULN)	Metanephrine response	RECIST 1.1	PERCIST 1.0	Duration of response (months)
1	Yes	Intact	Yes	Response, normalization	No	–	NE ¹	PMR	30
2	Yes	NA	Yes	Stable	Yes (NMN and MT)	Stable	SD	PMD	3
3	Yes	Deficient	Yes	Response, normalization	NA	NA	PR	PMR	13
4	Yes	Deficient	Yes	Response	No	–	SD	SMD	8
5	Yes	Deficient	No	–	Yes (NMN)	Response normalization	PR	PMR	26
6	Yes	Deficient	Yes	Response, normalization	No	–	PR	PMR	21
7	Yes	NA	Yes	Progression	Yes (NMN and MT)	Progression	PD	PMD	3
8	Yes	Deficient	No	–	Yes (NMN)	Response normalization	PR	PMR	22
9	Yes	Intact	Yes	Response	Yes (NMN and MT)	Stable	SD	SMD	7
10	Yes	NA	NA	NA	NA	NA	NE ¹	SMD	16
11	No	NA	Yes	Stable	Yes (MN, NMN and MT)	Stable	NE ¹	PMD	3
12	No	Intact	No	–	Yes (MT)	Stable	SD	PMD	9
13	No	Intact	Yes	Progression	Yes (MN, NMN and MT)	Progression	SD	NA ²	14
14	No	Intact	Yes	Stable	NA	NA	SD	PMD ³	4
15	No	NA	NA	NA	NA	NA	NA ⁴	NA ⁴	1

¹Bone only disease. ²MIBG evaluation. ³Progressive metabolic disease according to medical file but PERCIST review could not be performed (baseline pictures lacking). ⁴No imaging exam available due to death during the first 3 months of treatment. SDHB mutation: yes = mutation present, no = no mutation.

CgA response was defined as a CgA concentration following treatment that was 50% lower than that of baseline CgA concentration. CgA progression was defined as a CgA concentration following treatment that was 50% higher than that of baseline CgA concentration. CgA normalization was defined by return to normal value.

Urinary Metanephrines/creatinine response was defined as a urinary concentration of total metanephrines [UTM; i.e., Metanephrine (MN) + normetanephrine (NMN) + methoxytyramine (MT), all normalized by creatinine] following treatment that was 50% lower than that of baseline UTM. Urinary Metanephrines progression was defined as a UTM following treatment that was 50% higher than that of baseline UTM. UTM normalization was defined by return to normal value.

Abbreviations: PR: partial response; SD: Stable Disease; PD: Progressive Disease; PMR: Partial Metabolic Response; SMD: Stable Metabolic Disease; PMD: Progressive Metabolic Disease; NA: Not available; NE: Not evaluable.

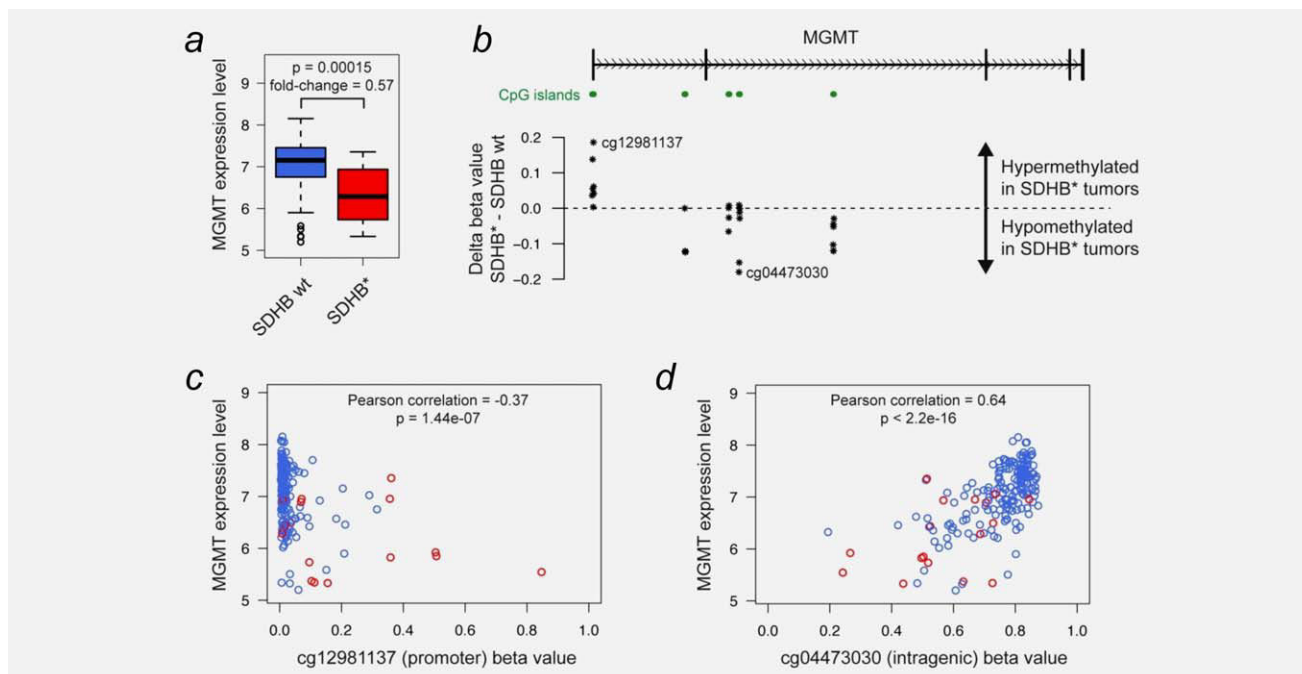


Figure 3. *MGMT* expression and promoter methylation in an independent cohort of 190 patients with PP. *MGMT* expression level (a) measured with the Affymetrix HG-U133 plus 2.0 expression arrays in tumour samples from 17 *SDHB*-related patients with PP (*SDHB**, red) and 173 non *SDHB*-related patients with PP (*SDHB* nonmutated, blue). *MGMT* DNA methylation beta values of 26 CpGs belonging to five CpG islands (one in the promoter region and four in intronic regions) in *SDHB*- or non-*SDHB*-related tumours measured using the Illumina Infinium HM27 DNA methylation assay (b). Correlation of *MGMT* promoter methylation status (cg12981137, most significantly hypermethylated CpG in the *MGMT* promoter) with *MGMT* expression levels in *SDHB*-related PP (red circles) or non-*SDHB*-related PP (blue circles; c). Correlation of *MGMT* intronic methylation status (cg04473030, most significantly hypomethylated intragenic CpG) with *MGMT* expression levels in *SDHB*-related PP (red circles) or non *SDHB*-related PP (blue circles; d).

extraction by two different techniques, we did not obtain reproducible and interpretable results of *MGMT* promoter methylation in these samples. This was probably due to poor DNA quality resulting from inadequate fixation and prolonged storage.

We explored further the relationship between *SDHB* mutation status, *MGMT* expression, and *MGMT* promoter methylation in an independent cohort of 190 PPs. *MGMT* expression was significantly lower in the 17 *SDHB*-related tumours than in the 173 tumours without mutation in *SDHB* ($p = 0.00015$, Figure 3a, Supporting Information Table 1). We obtained DNA methylation beta values for 26 CpG sites, belonging to five CpG islands located in the promoter and in the gene body of *MGMT*. *SDHB*-related tumours showed a significant hypermethylation of the promoter CpG island (FDR-adjusted $p = 2.19 \times 10^{-5}$ for cg12981137, Wilcoxon rank-sum test), whereas the four CpG islands located in the gene body were significantly hypomethylated in these samples (Figure 3b, Supporting Information Table 2). Interestingly, the single *FH*-related MPP case evaluated in this study³⁶ displayed a profile similar to that of *SDHB*-mutated MPP with regard to promoter CpG island methylation and the expression of *MGMT*. Besides this isolated case, these perturbations to the methylation and expression of *MGMT* were restricted to *SDHB*-related MPP. Indeed, such perturbations were not

observed in any other subtype of inherited or malignant tumour, which all showed a largely homogenous profile of *MGMT* expression and promoter methylation. We then examined the correlation between *MGMT* expression and the methylation of the CpG that was the most significantly hypermethylated (cg12981137, promoter) and the CpG that was the most significantly hypomethylated (cg04473030, intragenic) in *SDHB*-related tumours. Promoter methylation was negatively correlated with *MGMT* expression ($p = 1.44 \times 10^{-7}$, Figure 3c), whereas intragenic methylation was positively correlated with *MGMT* expression ($p < 2.2 \times 10^{-16}$, Figure 3d).

Discussion

In this study, we show that TMZ as a single chemotherapeutic agent is an effective antitumour agent in a well-characterized series of consecutive patients with progressive MPP. This study has several limitations related to the scarcity of this disease, notably the small sample size and the retrospective design. Nonetheless, no comparative study using other cytotoxic agents exists. Indeed, this study is the first of its kind to (i) characterise the progressive status of patients with MPP at the time of their entry in the study^{9–12,15}; (ii) carefully evaluate PFS using standardized RECIST 1.1 and PERCIST 1.0 criteria as recommended^{8,23,24} and (iii) recruit patients in a limited period of time (3.75 patients per year in

the present study, which contrasts with the rate of 1.5–1.7 patients per year in previous studies^{9–13}). The median PFS was 13.3 months, suggesting TMZ is an effective antitumour agent because all patients were progressive during the preceding year. This observation is of major importance because we previously showed that half of therapy-naïve patients with MPP achieve stable disease at 1 year.³ Toxicity was manageable and the types of toxicity were in line with previous studies. Therefore, the use of temozolomide as a single agent to treat progressive MPP could challenge the benefit of the polychemotherapy CVD regimen. Indeed, 33% of patients responded to treatment according to both RECIST and PERCIST criteria, which is similar to the antitumour efficacy of the CVD regimen in patients with MPP that also induces frequent and high grade toxicities.^{9–13} In addition, 10 of the 15 patients (67%) experienced a clinical benefit defined as a partial response or a stabilization of their disease for more than 6 months. We found that CgA response correlated with morphological or metabolic responses and therefore could be tested as a putative surrogate of survival or tumour response in future prospective trials.

A partial response was experienced in 50% of patients with mutation in *SDHB*, whereas none of the patients without mutation in *SDHB* experienced a partial response. Interestingly, there was a significant difference in PFS between patients with mutation in *SDHB* (19.7 months), and patients without mutation in *SDHB* (2.9 months), suggesting that *SDHB* mutation may be a biomarker for temozolomide efficacy. Although a relationship between *SDHB* mutational status and TMZ response was previously suggested in case reports,^{14,15} our study is the first demonstration of such a relationship. Indeed, this study involves consecutive patients with different genetic statuses who were evaluated according to formalized criteria for the assessment of tumour response.^{23,24} Moreover, as reported previously, patients with MPP and mutations in *SDHB* have lower survival rates than MPP patients without mutations in *SDHB*,⁴ which may lead to an underestimation in the potential benefit of TMZ in this population. One previous study analysed the effectiveness of chemotherapy in subgroups of patients with MPP who were characterized for *SDHx* mutations¹⁰: partial responses were observed both in small subgroups of patients with or without *SDHx* mutations. Therefore, a larger clinical trial is required to confirm these results. In the case report by Nozières *et al.*,³⁷ one patient with mutation in *SDHB* demonstrated a 70% partial response to TMZ and capecitabine: *MGMT* was not expressed in tumour samples from this patient and the promoter of the gene was hypermethylated.

This study does not formally meet the criteria of a Phase II clinical trial because the number of patients who were included was too small; nonetheless, we strived to fulfil all of the quality requirements of a Phase II trial in a retrospective setting. However, the lack of a control group, the small sample size, and the retrospective design of this study limit conclusions about the efficacy of TMZ. Nonetheless, this study is

the first to suggest that a personalized therapeutic approach may be applicable to MPP, and our findings even shed light on the mechanism underlying the response of this rare cancer to TMZ. However, prospective studies are needed to confirm these results.

TMZ has a high antitumour activity in *MGMT*-deficient tumours, both in patients with glioblastomas and in patients with gastroenteropancreatic NET.^{21,22} We investigated *MGMT* protein expression in ten available tumour specimens. TMZ causes DNA methyl-adducts and *MGMT* is implicated in the cell detoxification process by repairing O6-m^eGuanine adducts.³⁸ In our study, *MGMT* expression (as assessed by immunohistochemistry) was deficient in tumour samples from four of the five patients with mutation in *SDHB* who responded to treatment. These results suggest that *MGMT* expression may help to refine the subpopulation of patients in which TMZ therapy should be considered. However, the most appropriate methodology to evaluate *MGMT* status in NET remains to be determined. Indeed, the analysis of *MGMT* promoter methylation by bisulphite coupled with pyrosequencing or methylation-specific PCR was more reliable than expression analysis for predicting the response of patients with glioblastoma to TMZ.³⁹ However, as shown by our experience, such analyses of methylation require high quality DNA. We also found that *MGMT* expression was significantly lower in tumour samples from patients with mutation in *SDHB* than in those from patients without mutation in *SDHB* in an independent confirmatory cohort (from the French COMETE collection). Furthermore, we demonstrated a correlation between mutation in *SDHB* and *MGMT* promoter hypermethylation, hypomethylation of intragenic CpG sites, and a low abundance of *MGMT* mRNA. These results suggest that *SDHB* mutation may down-regulate *MGMT* expression in tumour cells by affecting the methylation of *MGMT*, and hence its epigenetic status. Interestingly, succinate accumulates in *SDH*-deficient tumours and acts as a competitive inhibitor of TET enzymes that are members of the 2-oxoglutarate dioxygenases family of enzymes. TET enzymes participate in DNA demethylation, hence the accumulation of succinate causes a DNA hypermethylator phenotype in this subset of tumours.³⁶ Although this explains the strong *MGMT* promoter hypermethylation, the mechanism leading to intragenic *MGMT* hypomethylation observed in *SDHB*-mutated tumours remains to be unravelled.

In conclusion, this is the first demonstration that temozolomide is an effective antitumour agent that is associated with manageable toxicity for the treatment of progressive MPP, especially in patients with mutation in *SDHB*. Further prospective studies are needed to confirm these results. We hypothesize that *MGMT* promoter hypermethylation in *SDHB*-related tumours leads to the silencing of *MGMT* expression. This study opens the door to an approach involving personalized medicine for the treatment of patients with MPP.

Acknowledgements

We thank the nurses of the Nuclear Medicine and Endocrine Oncology Department at Institut Gustave Roussy. We thank Emeline Pallaud for editing the English of this article. We thank the "Ligue Nationale contre le Can-

cer" who funded and developed a national program "Cartes d'Identité des Tumeurs" which includes this work (<http://cit.ligue-cancer.net/index.pheochromocytomap/en>). We also thank the GIS-Institut des Maladies Rares for the PGL.NET Network and the COMETE network for support.

References

- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, et al. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. In: IARC WHO Classification of Tumours. France: IARC, 2004.
- Gimenez-Roqueplo A-P, Dahia PL, Robledo M. An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm Metab Res* 2012;44:328–33.
- Hescot S, Lebouleux S, Amar L, et al. One-year progression-free survival of therapy-naïve patients with malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:4006–12.
- Amar L, Baudin E, Burnichon N, et al. Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3822–8.
- Ayala-Ramirez M, Feng L, Johnson MM, et al. Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:717–25.
- Feng F, Zhu Y, Wang X, et al. Predictive factors for malignant pheochromocytoma: analysis of 136 patients. *J Urol* 2011;185:1583–90.
- Ayala-Ramirez M, Palmer JL, Hofmann M-C, et al. Bone metastases and skeletal-related events in patients with malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:1492–7.
- Berruti A, Baudin E, Gelderblom H, et al., on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;23:vii131–vii138.
- Averbuch SD, Steakley CS, Young RC, et al. Malignant pheochromocytoma: effective treatment with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine. *Ann Intern Med* 1988;109:267–73.
- Ayala-Ramirez M, Feng L, Habra MA, et al. Clinical benefits of systemic chemotherapy for patients with metastatic pheochromocytomas or sympathetic extra-adrenal paragangliomas: insights from the largest single-institutional experience. *Cancer* 2012;118:2804–12.
- Huang H, Abraham J, Hung E, et al. Treatment of malignant pheochromocytoma/paraganglioma with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine: recommendation from a 22-year follow-up of 18 patients. *Cancer* 2008;113:2020–8.
- Patel SR, Winchester DJ, Benjamin RS. A 15-year experience with chemotherapy of patients with paraganglioma. *Cancer* 1995;76:1476–80.
- Tanabe A, Naruse M, Nomura K, et al. Combination chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine in patients with malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Horm Cancer* 2013;4:103–10.
- He J, Makey D, Fojo T, et al. Successful chemotherapy of hepatic metastases in a case of succinate dehydrogenase subunit B-related paraganglioma. *Endocrine* 2009;36:189–93.
- Jawed I, Amiri-Kordestani L, Velarde M, et al. High efficacy and continued tumor shrinkage with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine (CVD) in patients (Pts) with malignant pheochromocytoma/paraganglioma harboring succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) mutations. *ASCO Meeting Abstracts* 2011;29:2526.
- Altamir AF, Badrinath K, Reisel HJ, et al. DTIC therapy in patients with malignant intra-abdominal neuroendocrine tumors. *Surgery* 1987;102:1009–17.
- Bravo EL, Kalmadi SR, Gill I. Clinical utility of temozolomide in the treatment of malignant paraganglioma: a preliminary report. *Horm Metab Res* 2009;41:703–6.
- Kulke MH, Stuart K, Enzinger PC, et al. Phase II study of temozolomide and thalidomide in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:401–6.
- Dhodapkar M, Rubin J, Reid JM, et al. Phase I trial of temozolomide (NSC 362856) in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1093–100.
- Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000;18:158–66.
- Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:997–1003.
- Kulke MH, Hornick JL, Fraumeni C, et al. O6-methylguanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:338–45.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228–47.
- Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, et al. From RECIST to PERCIST: evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* 2009;50 Suppl 1:122S–50S.
- Buffet A, Venisse A, Nau V, et al. A decade (2001–2010) of genetic testing for pheochromocytoma and paraganglioma. *Horm Metab Res* 2012;44:359–66.
- Baudin E, Bidart JM, Bachelot A, et al. Impact of chromogranin A measurement in the work-up of neuroendocrine tumors. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 2:S79–82.
- Baudin E, Gigliotti A, Ducreux M, et al. Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours. *Br J Cancer* 1998;78:1102–7.
- Amar L, Peyrard S, Rossignol P, Zinzindohoue F, et al. Changes in urinary total metanephrine excretion in recurrent and malignant pheochromocytomas and secreting paragangliomas. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1073:383–91.
- Abgral R, Lebouleux S, Déandreis D, et al. Performance of (18)fluorodeoxyglucose-positron emission tomography and somatostatin receptor scintigraphy for high Ki67 ($\geq 10\%$) well-differentiated endocrine carcinoma staging. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:665–71.
- Dromain C, de Baere T, Lumbroso J, et al. Detection of liver metastases from endocrine tumors: a prospective comparison of somatostatin receptor scintigraphy, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol* 2005;23:70–8.
- Lebouleux S, Dromain C, Vataire AL, et al. Prediction and diagnosis of bone metastases in well-differentiated gastro-entero-pancreatic endocrine cancer: a prospective comparison of whole body magnetic resonance imaging and somatostatin receptor scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3021–8.
- Ekeblad S, Sundin A, Janson ET, et al. Temozolomide as monotherapy is effective in treatment of advanced malignant neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13:2986–91.
- Burnichon N, Vescovo L, Amar L, et al. Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Hum Mol Genet* 2011;20:3974–85.
- Bibikova M, Le J, Barnes B, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. *Epigenomics* 2009;1:177–200.
- Yao JC, Pavel M, Phan AT, et al. Chromogranin A and neuron-specific enolase as prognostic markers in patients with advanced pNET treated with everolimus. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3741–9.
- Letouzé E, Martinelli C, Lorient C, et al. SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell* 2013;23:739–52.
- Nozières C, Walter T, Joly M-O, et al. A SDHB malignant paraganglioma with dramatic response to temozolomide-capecitabine. *Eur J Endocrinol* 2012;166:1107–11.
- Sharma S, Salehi F, Scheithauer BW, et al. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Res* 2009;29:3759–68.
- Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, methyl-ight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* 2012;118:4201–11.

***SDHB* mutations predict response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma and paraganglioma.**

SUPPLEMENTARY MATERIAL

SUPPLEMENTARY METHODS

O6-methylguanine–DNA methyltransferase (MGMT) expression by immunohistochemistry

Tissue sections were fixed in formalin or AFA (Alcohol, Formalin and Acetic Acid) and embedded in paraffin. Four micrometers-thick tissue sections were prepared. Antigen retrieval was achieved by placing slides in 98 °C citrate buffer (pH 6.0) for 30 minutes. Endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide, whereas nonspecific binding was blocked with “Protein block” (Novolink kit / Novocastra-Ménarini) for 20 minutes. Sections were then incubated at room temperature with a monoclonal mouse anti-MGMT antibody (Neomarkers, MS-470-PABX, 1:50 dilution) for 60 minutes, then with Novolink kit. Peroxidase activity was revealed by using 3,3'-diaminobenzidine (Dako) as chromogen. Nuclear counterstain was performed by using Mayer hematoxylin.

The entire section was analyzed along with the hematoxylin and eosin-stained mirror section. The percentage of tumor nuclei positive for MGMT was determined. A colic adenocarcinoma with high MGMT protein expression was used as a positive control. Tissue samples were also assayed with mouse IgG1 antibody as negative controls to rule out nonspecific reaction. Staining of endothelial cells was used as positive internal control.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1: Differential methylation analysis of MGMT gene in SDHB-mutant and SDHB wt pheochromocytomas and paragangliomas.

	CpG	Position (Hg19)	Distance to TSS	Mean beta value in SDHB wt tumors	Mean beta value in SDHB* tumors	Delta	Pvalue	FDR-adjusted p-value
CGI 1	cg02330106	131264840	-626	0.695	0.731	0.0363	0.325	0.375
	cg25946389	131265073	-393	0.143	0.28	0.138	3.29e-04	0.00171
	cg12434587	131265209	-257	0.0178	0.0729	0.055	1.06e-06	2.19e-05
	cg19706602	131265435	-31	0.077	0.0803	0.0033	0.419	0.453
	cg12981137	131265575	109	0.0271	0.213	0.186	1.68e-06	2.19e-05
	cg02941816	131265696	230	0.0801	0.141	0.0608	0.00488	0.0159
CGI 2	cg26201213	131265796	330	0.659	0.7	0.0414	0.309	0.375
	cg24580056	131321587	56121	0.848	0.847	-1.53e-04	0.275	0.375
	cg12040555	131321830	56364	0.722	0.602	-0.121	0.0145	0.0377
CGI 3	cg14129786	131321947	56481	0.57	0.446	-0.124	0.0013	0.00481
	cg20537325	131348421	82955	0.857	0.791	-0.0656	0.0371	0.0742
	cg27056559	131348484	83018	0.861	0.862	9.04e-04	0.32	0.375
	cg07638938	131348599	83133	0.774	0.747	-0.0265	0.0971	0.18
	cg10036895	131348664	83198	0.775	0.782	0.00734	0.846	0.88
CGI 4	cg04473030	131354782	89316	0.757	0.576	-0.18	2.78e-06	2.41e-05
	cg00904483	131354873	89407	0.818	0.827	0.00883	0.893	0.893
	cg10333959	131354940	89474	0.794	0.641	-0.153	1.07e-04	6.98e-04
	cg02381948	131355112	89646	0.799	0.788	-0.0117	0.108	0.187
	cg20778669	131355217	89751	0.712	0.684	-0.0284	0.149	0.242
CGI 5	cg07453748	131355302	89836	0.813	0.812	-0.001	0.29	0.375
	cg02803836	131412507	147041	0.869	0.766	-0.103	9.83e-04	0.00426
	cg19680672	131412579	147113	0.526	0.406	-0.12	0.0175	0.0414
	cg03271907	131412643	147177	0.833	0.788	-0.045	0.0291	0.0631
	cg18488970	131412701	147235	0.606	0.554	-0.0519	0.204	0.312
	cg17686260	131412764	147298	0.725	0.605	-0.12	0.00866	0.025
	cg16698623	131412968	147502	0.787	0.758	-0.029	0.332	0.375

Supplementary Table 1 legend:

Significant hypermethylated (resp. hypomethylated) CpGs are highlighted in yellow (resp. in blue).

38

3

HL_132	MAX	Somatic	0.591306	0.0055802	0.0119339	0.0720125	0.0204216	0.107594	0.783686	0.807342	0.322336	0.405454	0.846217	0.470344	0.703762	0.800736	0.879436	0.020677	0.478301	0.780135	0.838633	0.020666	0.762227	0.247122	0.170324	0.530869	0.860674	0.805345
HL_133	RET	Germline	0.190861	0.0033262	0.0071939	0.076602	0.0204469	0.0093926	0.497491	0.906742	0.173487	0.772286	0.888237	0.873745	0.739174	0.849454	0.883731	0.882363	0.849703	0.849128	0.883731	0.882363	0.849703	0.739174	0.849454	0.883731	0.882363	0.849703
HL_134	RET	Germline	0.191076	0.003419	0.0124277	0.0268267	0.0108265	0.0402736	0.288465	0.886232	0.174267	0.826041	0.88671	0.882617	0.707677	0.749662	0.822637	0.826047	0.812412	0.842494	0.749662	0.822637	0.812412	0.842494	0.749662	0.822637	0.812412	0.842494
HL_136	RET	Germline	0.850515	0.0440756	0.00739619	0.0170638	0.0545456	0.0366765	0.8176731	0.886787	0.446233	0.817673	0.886787	0.800539	0.767031	0.858424	0.869442	0.800539	0.846135	0.886801	0.858424	0.869442	0.800539	0.767031	0.858424	0.869442	0.800539	0.767031
HL_137	AVL	Germline	0.867462	0.0115779	0.00368681	0.01742487	0.02684134	0.0343648	0.707602	0.885221	0.811108	0.707602	0.885221	0.866476	0.730881	0.886823	0.867447	0.881015	0.846765	0.810744	0.867447	0.881015	0.846765	0.810744	0.867447	0.881015	0.846765	0.810744
HL_138	SDHB	Germline	0.176407	0.024036	0.0073423	0.0437682	0.103326	0.0112621	0.857701	0.873881	0.516851	0.324162	0.917504	0.838504	0.862339	0.912691	0.417382	0.762663	0.932636	0.773237	0.837574	0.841761	0.801203	0.344518	0.838504	0.862339	0.912691	
HL_139	RET	Germline	0.806973	0.071565	0.00467436	0.0607511	0.0115127	0.0357467	0.586794	0.877427	0.79167	0.746237	0.878564	0.878473	0.71265	0.771732	0.817313	0.848854	0.837569	0.861218	0.771687	0.811468	0.731116	0.878139	0.827741	0.837569	0.878139	
HL_140	AVL	Germline	0.686608	0.020932	0.00683818	0.0791582	0.0107783	0.0232404	0.5887764	0.860754	0.742593	0.846014	0.860754	0.808325	0.741465	0.710818	0.81477	0.712791	0.746456	0.898922	0.81477	0.712791	0.746456	0.898922	0.81477	0.712791	0.746456	
HL_141	AVL	Germline	0.834916	0.042179	0.00677517	0.0691587	0.00501338	0.0173894	0.533873	0.814141	0.86234	0.546474	0.846011	0.845622	0.713015	0.730396	0.736717	0.84547	0.736823	0.735482	0.741805	0.730397	0.917403	0.859448	0.8287	0.736724	0.741805	
HL_143	AVL	Germline	0.020289	0.0671255	0.0042121	0.0641627	0.0132135	0.0112663	0.454738	0.866876	0.455665	0.200556	0.476237	0.877361	0.82391	0.770454	0.83023	0.741797	0.721127	0.736613	0.776471	0.509112	0.622138	0.83365	0.711671	0.736613	0.83365	
HL_144	SDHB	Germline	0.734233	0.037309	0.0745174	0.105678	0.361124	0.217177	0.828613	0.886276	0.347768	0.362222	0.882424	0.863542	0.765191	0.841744	0.91356	0.873884	0.873217	0.847487	0.873884	0.873217	0.847487	0.873884	0.873217	0.847487	0.873884	
HL_145	SDHB	Germline	0.725141	0.042927	0.0071767	0.102462	0.102142	0.177949	0.538802	0.822945	0.619458	0.5132	0.827662	0.843435	0.731544	0.744128	0.819185	0.701882	0.744611	0.738444	0.882731	0.858729	0.826327	0.522145	0.817469	0.842424	0.740489	
HL_146	AVL	Germline	0.791087	0.047168	0.0148023	0.0202882	0.0232441	0.0256427	0.826247	0.814751	0.775142	0.817682	0.874264	0.729174	0.736441	0.775382	0.843637	0.812412	0.842494	0.749662	0.822637	0.812412	0.842494	0.749662	0.822637	0.812412	0.842494	
HL_147	MF1	Somatic	0.440056	0.0145323	0.00613949	0.0073051	0.0067134	0.0046355	0.164248	0.830758	0.0046355	0.164248	0.830758	0.002657	0.819175	0.83345	0.826527	0.805558	0.861764	0.826527	0.805558	0.861764	0.826527	0.805558	0.861764	0.826527	0.805558	
HL_148	MF1	Syndromic	0.337106	0.0032876	0.00878154	0.046875	0.00776813	0.0458943	0.8181259	0.732847	0.443722	0.807583	0.847229	0.874263	0.824958	0.818126	0.712628	0.750454	0.839182	0.812001	0.443449	0.838266	0.861327	0.174488	0.748684	0.8417772	0.738884	
HL_149	SDHB	Germline	0.837369	0.048749	0.0477923	0.0141224	0.0095814	0.434423	0.836279	0.879494	0.840345	0.847787	0.820478	0.848408	0.789362	0.752374	0.889714	0.843459	0.840345	0.779515	0.889714	0.843459	0.840345	0.779515	0.889714	0.843459	0.840345	
HL_150	AVL	Germline	0.613463	0.062772	0.00304887	0.0671023	0.0121794	0.003176	0.741264	0.715144	0.411887	0.905568	0.852377	0.828251	0.726665	0.730788	0.825745	0.845109	0.768872	0.86816	0.811853	0.859515	0.841416	0.820238	0.841754	0.859515	0.841416	
HL_151	RET	Germline	0.706863	0.003448	0.00777634	0.0599147	0.0588882	0.0737373	0.857782	0.856263	0.795887	0.462244	0.888036	0.868839	0.813093	0.840428	0.838478	0.841227	0.818187	0.787287	0.818119	0.802804	0.898261	0.838744	0.741201	0.864741	0.822369	
HL_152	RET	Germline	0.858746	0.009129	0.0142352	0.0748222	0.0071083	0.0038832	0.823715	0.838147	0.737889	0.886443	0.882871	0.83889	0.718543	0.747438	0.772347	0.88322	0.782173	0.732885	0.814514	0.806803	0.815119	0.881149	0.824012	0.847473	0.763822	
HL_153	AVL	Germline	0.500764	0.07378	0.0176823	0.006236	0.0226848	0.0088828	0.407511	0.836839	0.837461	0.814782	0.865439	0.773249	0.817546	0.819237	0.820445	0.742682	0.747187	0.889124	0.771319	0.823796	0.82825	0.842238	0.747187	0.773799	0.889743	
HL_154	MF1	Somatic	0.97701	0.0088239	0.01759911	0.0077988	0.0247913	0.0081446	0.826772	0.723545	0.446424	0.864743	0.774417	0.82347	0.747351	0.817144	0.823241	0.734605	0.833386	0.737338	0.848769	0.736966	0.837187	0.988201	0.848769	0.837187	0.988201	
HL_155	AVL	Germline	0.82019	0.018912	0.00491432	0.0294182	0.0244269	0.8308249	0.830817	0.832508	0.846232	0.84614	0.781487	0.834541	0.847718	0.738855	0.887874	0.773458	0.845874	0.839714	0.839714	0.845874	0.839714	0.839714	0.845874	0.839714	0.839714	
HL_156	RET	Germline	0.791538	0.003973	0.00735938	0.041447	0.0332344	0.00994	0.866787	0.734541	0.833369	0.846126	0.817028	0.710284	0.846232	0.846889	0.84713	0.838544	0.835283	0.845446	0.848891	0.847237	0.845446	0.848891	0.847237	0.845446	0.848891	
HL_157	AVL	Germline	0.835882	0.001124	0.031472	0.108882	0.0071286	0.0011288	0.513833	0.841779	0.83882	0.841779	0.83882	0.845358	0.789682	0.837467	0.831982	0.865538	0.84814	0.819137	0.888281	0.819137	0.888281	0.819137	0.888281	0.819137	0.888281	
HL_158	SDHD	Germline	0.541725	0.113375	0.0170465	0.0097246	0.0088703	0.0063878	0.818476	0.83203	0.846449	0.817404	0.846449	0.810791	0.841261	0.732679	0.73262	0.868387	0.868383	0.868154	0.828865	0.791168	0.847082	0.777212	0.775241	0.847082	0.775241	
HL_159	AVL	Germline	0.755854	0.023482	0.00777634	0.061328	0.0111439	0.0791187	0.533838	0.792718	0.873484	0.846832	0.879424	0.791382	0.869715	0.83938	0.775817	0.833435	0.850194	0.87948	0.833835	0.870335	0.844829	0.84737	0.87948	0.84737	0.87948	
HL_160	MF1	Somatic	0.405149	0.0086878	0.0088774	0.102615	0.011511	0.0175227	0.505251	0.816137	0.83546	0.888264	0.888271	0.711851	0.817423	0.815785	0.789138	0.817453	0.821451	0.736458	0.85645	0.891766	0.817453	0.821451	0.85645	0.891766	0.817453	
HL_162	MF1	Somatic	0.755852	0.0086878	0.0088774	0.102615	0.011511	0.0175227	0.505251	0.816137	0.83546	0.888264	0.888271	0.711851	0.817423	0.815785	0.789138	0.817453	0.821451	0.736458	0.85645	0.891766	0.817453	0.821451	0.85645	0.891766	0.817453	
HL_163	AVL	Germline	0.812083	0.0014287	0.00491432	0.0181881	0.0288468	0.0276324	0.740883	0.857163	0.847346	0.836127	0.736933	0.771127	0.727611	0.817442	0.888812	0.73137	0.734832	0.817158	0.839172	0.778227	0.868878	0.817158	0.839172	0.778227	0.868878	
HL_164	RET	Germline	0.823748	0.003748	0.0114201	0.0478478	0.0108821	0.0478478	0.818884	0.835512	0.710883	0.823271	0.827147	0.871421	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	0.847431	
HL_165	RET	Germline	0.856457	0.007169	0.0133872	0.0174848	0.0054648	0.0338875	0.837374	0.837368	0.868425	0.869443	0.871413	0.876381	0.8421	0.83025	0.868425	0.868425	0.868425	0.868425	0.868425	0.868425	0.868425	0.868425	0.868425	0.868425	0.868425	
HL_167	MF1	Somatic	0.828882	0.041513	0.0158272	0.147218	0.0225173	0.0080176	0.820213	0.78558	0.911268	0.841778	0.732622	0.704885	0.848544	0.832288	0.818182	0.818791	0.848945	0.862918	0.818791	0.848945	0.862918	0.818791	0.848945	0.862918	0.818791	
HL_168	SDHB	Germline	0.848584	0.008438	0.0147753	0.0094428	0.0245642	0.0047758	0.754225	0.845246	0.841719	0.845246	0.841719	0.845246	0.773911	0.837339	0.845246	0.845246	0.845246	0.845246	0.845246	0.845246	0.845246	0.845246	0.845246	0.845246	0.845246	
HL_169	MF1	Somatic	0.474521	0.008219	0.0078498	0.040451	0.0177457	0.0089191	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	0.835238	
HL_170	RET	Germline	0.868843	0.008836	0.0021438	0.112734	0.0145882	0.0217867	0.572461	0.739177	0.810883	0.																

46 **LEGENDS OF SUPPLEMENTARY FIGURE**

47

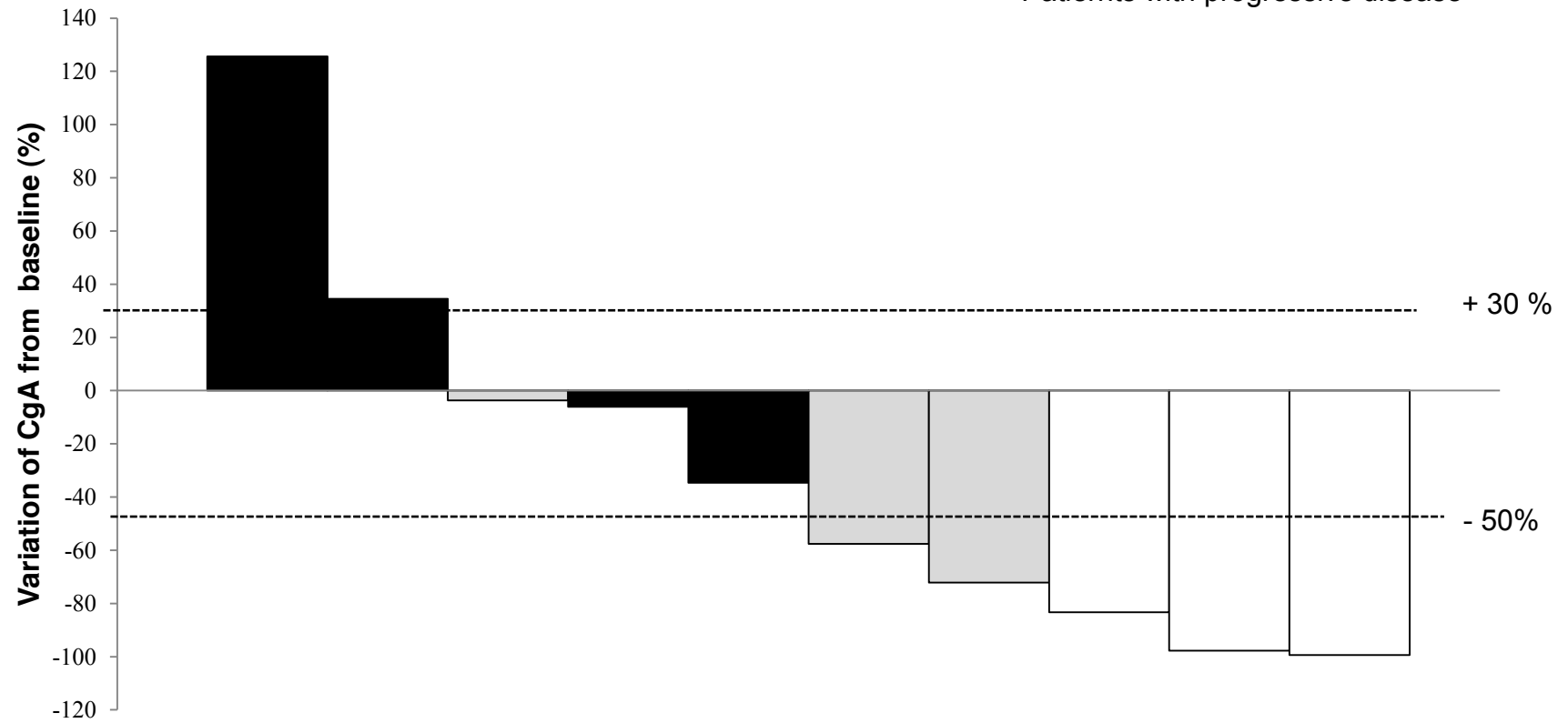
48 **Supplementary figure 1 title:** CgA variation during temozolomide treatment and

49 correlation with response

50

Supplementary Figure1: CgA Response

- Patients with partial response
- Patients with stable disease
- Patients with progressive disease



BIBLIOGRAPHIE

1. Bronner, M.E. and N.M. LeDouarin, *Development and evolution of the neural crest: an overview*. Dev Biol, 2012. **366**(1): p. 2-9.
2. Le Douarin, N.M., et al., *Neural crest cell plasticity and its limits*. Development, 2004. **131**(19): p. 4637-50.
3. Goldstein, R.E., et al., *Clinical experience over 48 years with pheochromocytoma*. Ann Surg, 1999. **229**(6): p. 755-64; discussion 764-6.
4. Timmers, H.J., et al., *Biochemically silent abdominal paragangliomas in patients with mutations in the succinate dehydrogenase subunit B gene*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(12): p. 4826-32.
5. Shamblin, W.R., et al., *Carotid body tumor (chemodectoma). Clinicopathologic analysis of ninety cases*. Am J Surg, 1971. **122**(6): p. 732-9.
6. Barron, J., *Phaeochromocytoma: diagnostic challenges for biochemical screening and diagnosis*. J Clin Pathol, 2010. **63**(8): p. 669-74.
7. Peaston, R.T. and C. Weinkove, *Measurement of catecholamines and their metabolites*. Ann Clin Biochem, 2004. **41**(Pt 1): p. 17-38.
8. Eisenhofer, G., et al., *Differential expression of the regulated catecholamine secretory pathway in different hereditary forms of pheochromocytoma*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(5): p. E1223-33.
9. Eisenhofer, G., et al., *Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in phaeochromocytoma*. Endocr Relat Cancer, 2011. **18**(1): p. 97-111.
10. Eisenhofer, G., et al., *Biochemical and clinical manifestations of dopamine-producing paragangliomas: utility of plasma methoxytyramine*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 2068-75.
11. Eisenhofer, G., I.J. Kopin, and D.S. Goldstein, *Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(3): p. 331-49.
12. Eisenhofer, G., et al., *Measurements of plasma methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine as discriminators of different hereditary forms of pheochromocytoma*. Clin Chem, 2011. **57**(3): p. 411-20.
13. Eisenhofer, G., et al., *Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma*. Rev Endocr Metab Disord, 2001. **2**(3): p. 297-311.
14. Eisenhofer, G., *Screening for pheochromocytomas and paragangliomas*. Curr Hypertens Rep, 2012. **14**(2): p. 130-7.
15. Lenders, J.W., et al., *Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best?* Jama, 2002. **287**(11): p. 1427-34.
16. Goldstein, D.S., et al., *Diagnosis and localization of pheochromocytoma*. Hypertension, 2004. **43**(5): p. 907-10.
17. Pacak, K., et al., *Diagnostic localization of pheochromocytoma: the coming of age of positron emission tomography*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **970**: p. 170-6.
18. Ilias, I. and K. Pacak, *Anatomical and functional imaging of metastatic pheochromocytoma*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1018**: p. 495-504.
19. Ilias, I. and K. Pacak, *Current approaches and recommended algorithm for the diagnostic localization of pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(2): p. 479-91.
20. Ilias, I., et al., *Superiority of 6-[18F]-fluorodopamine positron emission tomography versus [131I]-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in the localization of metastatic pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(9): p. 4083-7.

21. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., *Imaging work-up for screening of paraganglioma and pheochromocytoma in SDHx mutation carriers: a multicenter prospective study from the PGL.EVA Investigators*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(1): p. E162-73.
22. Taieb, D., et al., *Modern nuclear imaging for paragangliomas: beyond SPECT*. J Nucl Med, 2012. **53**(2): p. 264-74.
23. Taieb, D., et al., *EANM 2012 guidelines for radionuclide imaging of phaeochromocytoma and paraganglioma*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. **39**(12): p. 1977-95.
24. Taieb, D., et al., *¹⁸F-FDG avidity of pheochromocytomas and paragangliomas: a new molecular imaging signature?* J Nucl Med, 2009. **50**(5): p. 711-7.
25. Sharma, P. and R. Kumar, *Nuclear medicine imaging in the evaluation of endocrine hypertension*. Indian J Endocrinol Metab, 2012. **16**(5): p. 706-12.
26. Tischler, A.S., N. Kimura, and A.M. McNicol, *Pathology of pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1073**: p. 557-70.
27. Park, J., et al., *Predictive characteristics of malignant pheochromocytoma*. Korean J Urol, 2011. **52**(4): p. 241-6.
28. Shen, W.T., et al., *Should pheochromocytoma size influence surgical approach? A comparison of 90 malignant and 60 benign pheochromocytomas*. Surgery, 2004. **136**(6): p. 1129-37.
29. Strong, V.E., et al., *Prognostic indicators of malignancy in adrenal pheochromocytomas: clinical, histopathologic, and cell cycle/apoptosis gene expression analysis*. Surgery, 2008. **143**(6): p. 759-68.
30. Agarwal, A., et al., *Size of the tumor and pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (PASS): can they predict malignancy?* World J Surg, 2010. **34**(12): p. 3022-8.
31. Ayala-Ramirez, M., et al., *Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(3): p. 717-25.
32. de Wailly, P., et al., *Malignant pheochromocytoma: new malignancy criteria*. Langenbecks Arch Surg, 2012. **397**(2): p. 239-46.
33. Linnoila, R.I., et al., *Histopathology of benign versus malignant sympathoadrenal paragangliomas: clinicopathologic study of 120 cases including unusual histologic features*. Hum Pathol, 1990. **21**(11): p. 1168-80.
34. John, H., et al., *Pheochromocytomas: can malignant potential be predicted?* Urology, 1999. **53**(4): p. 679-83.
35. Thompson, L.D., *Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(5): p. 551-66.
36. Gao, B., et al., *Development and validation of pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score for predicting malignant pheochromocytomas*. Urology, 2006. **68**(2): p. 282-6.
37. Wu, D., et al., *Observer variation in the application of the Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(4): p. 599-608.
38. Eisenhofer, G. and A.S. Tischler, *Neuroendocrine cancer: Closing the GAPP on predicting metastases*. Nat Rev Endocrinol, 2014.
39. Kimura, N., et al., *Pathologic grading for predicting metastasis in phaeochromocytoma and paraganglioma*. Endocr Relat Cancer, 2014.
40. Brown, H.M., et al., *Predicting metastasis of pheochromocytomas using DNA flow cytometry and immunohistochemical markers of cell proliferation: A positive correlation between MIB-1 staining and malignant tumor behavior*. Cancer, 1999. **86**(8): p. 1583-9.
41. van der Harst, E., et al., *Proliferative index in phaeochromocytomas: does it predict the occurrence of metastases?* J Pathol, 2000. **191**(2): p. 175-80.
42. Elder, E.E., et al., *KI-67 AND hTERT expression can aid in the distinction between malignant and benign pheochromocytoma and paraganglioma*. Mod Pathol, 2003. **16**(3): p. 246-55.

43. Salmenkivi, K., et al., *Lack of histologically suspicious features, proliferative activity, and p53 expression suggests benign diagnosis in pheochromocytomas*. Histopathology, 2003. **43**(1): p. 62-71.
44. August, C., et al., *CGH and CD 44/MIB-1 immunohistochemistry are helpful to distinguish metastasized from nonmetastasized sporadic pheochromocytomas*. Mod Pathol, 2004. **17**(9): p. 1119-28.
45. Tavangar, S.M., et al., *Immunohistochemical expression of Ki67, c-erbB-2, and c-kit antigens in benign and malignant pheochromocytoma*. Pathol Res Pract, 2010. **206**(5): p. 305-9.
46. Nativ, O., et al., *The clinical significance of nuclear DNA ploidy pattern in 184 patients with pheochromocytoma*. Cancer, 1992. **69**(11): p. 2683-7.
47. Jung, W.H., et al., *DNA flow cytometry in pheochromocytoma and paraganglioma*. Yonsei Med J, 1992. **33**(3): p. 249-57.
48. Gonzalez-Campora, R., et al., *Paragangliomas. Static cytometric studies of nuclear DNA patterns*. Cancer, 1993. **71**(3): p. 820-4.
49. Castilla-Guerra, L., et al., *Expression and prognostic value of c-erbB-2 oncogene product in human pheochromocytomas*. Histopathology, 1997. **31**(2): p. 144-9.
50. de Krijger, R.R., et al., *Prognostic value of p53, bcl-2, and c-erbB-2 protein expression in pheochromocytomas*. J Pathol, 1999. **188**(1): p. 51-5.
51. Yuan, W., et al., *Overexpression of ERBB-2 was more frequently detected in malignant than benign pheochromocytomas by multiplex ligation-dependent probe amplification and immunohistochemistry*. Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(1): p. 343-50.
52. Kubota, Y., et al., *Elevated levels of telomerase activity in malignant pheochromocytoma*. Cancer, 1998. **82**(1): p. 176-9.
53. Boltze, C., et al., *Expression profile of the telomeric complex discriminates between benign and malignant pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(9): p. 4280-6.
54. Boltze, C., et al., *HSP90 is a key for telomerase activation and malignant transition in pheochromocytoma*. Endocrine, 2003. **22**(3): p. 193-201.
55. Xu, Y., et al., *Expression and diagnostic relevance of heat shock protein 90 and signal transducer and activator of transcription 3 in malignant pheochromocytoma*. J Clin Pathol, 2013. **66**(4): p. 286-90.
56. Dahia, P.L., et al., *Molecular and immunohistochemical analysis of P53 in pheochromocytoma*. Br J Cancer, 1995. **72**(5): p. 1211-3.
57. Yoshimoto, T., et al., *The relatively high frequency of p53 gene mutations in multiple and malignant pheochromocytomas*. J Endocrinol, 1998. **159**(2): p. 247-55.
58. Lam, K.Y., et al., *The clinicopathological features and importance of p53, Rb, and mdm2 expression in pheochromocytomas and paragangliomas*. J Clin Pathol, 2001. **54**(6): p. 443-8.
59. Petri, B.J., et al., *Frequent loss of 17p, but no p53 mutations or protein overexpression in benign and malignant pheochromocytomas*. Mod Pathol, 2008. **21**(4): p. 407-13.
60. Salmenkivi, K., et al., *Increased expression of cyclooxygenase-2 in malignant pheochromocytomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(11): p. 5615-9.
61. Cadden, I.S., et al., *Cyclooxygenase-2 expression correlates with pheochromocytoma malignancy: evidence for a Bcl-2-dependent mechanism*. Histopathology, 2007. **51**(6): p. 743-51.
62. Saffar, H., et al., *Expression of galectin-3, nm-23, and cyclooxygenase-2 could potentially discriminate between benign and malignant pheochromocytoma*. Am J Clin Pathol, 2011. **135**(3): p. 454-60.
63. Zhu, Y., et al., *Heparanase-1 and Cyclooxygenase-2: prognostic indicators of malignancy in pheochromocytomas*. Endocrine, 2010. **38**(1): p. 93-9.
64. Salmenkivi, K., et al., *Inhibin/activin betaB-subunit expression in pheochromocytomas favors benign diagnosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 2231-5.

65. Fernandez, M.C., et al., *Overexpression of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) is associated with malignancy in familial pheochromocytomas and paragangliomas*. Clin Endocrinol (Oxf), 2013. **79**(5): p. 623-30.
66. Zielke, A., et al., *VEGF-mediated angiogenesis of human pheochromocytomas is associated to malignancy and inhibited by anti-VEGF antibodies in experimental tumors*. Surgery, 2002. **132**(6): p. 1056-63; discussion 1063.
67. Salmenkivi, K., et al., *VEGF in 105 pheochromocytomas: enhanced expression correlates with malignant outcome*. APMIS, 2003. **111**(4): p. 458-64.
68. Favier, J., et al., *Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors*. Am J Pathol, 2002. **161**(4): p. 1235-46.
69. Hayry, V., et al., *High frequency of SNAIL-expressing cells confirms and predicts metastatic potential of phaeochromocytoma*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(4): p. 1211-8.
70. Waldmann, J., et al., *Expression of the transcription factor snail and its target gene twist are associated with malignancy in pheochromocytomas*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(7): p. 1997-2005.
71. Khorram-Manesh, A., et al., *N-cadherin expression in adrenal tumors: upregulation in malignant pheochromocytoma and downregulation in adrenocortical carcinoma*. Endocr Pathol, 2002. **13**(2): p. 99-110.
72. Sadow, P.M., et al., *Stathmin expression in pheochromocytomas, paragangliomas, and in other endocrine tumors*. Endocr Pathol, 2008. **19**(2): p. 97-103.
73. Lin, W.C., et al., *Stathmin immunoreactivity in phaeochromocytomas and paragangliomas: differential expression between benign and malignant neoplasms*. Asian J Surg, 2011. **34**(1): p. 15-22.
74. Salmenkivi, K., et al., *Increased expression of tenascin in pheochromocytomas correlates with malignancy*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(11): p. 1419-23.
75. Eisenhofer, G., A.S. Tischler, and R.R. de Krijger, *Diagnostic tests and biomarkers for pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma: from routine laboratory methods to disease stratification*. Endocr Pathol, 2012. **23**(1): p. 4-14.
76. Eisenhofer, G., et al., *Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status*. Eur J Cancer, 2012. **48**(11): p. 1739-49.
77. van der Harst, E., et al., *The value of plasma markers for the clinical behaviour of phaeochromocytomas*. Eur J Endocrinol, 2002. **147**(1): p. 85-94.
78. Korevaar, T.I. and A.B. Grossman, *Pheochromocytomas and paragangliomas: assessment of malignant potential*. Endocrine, 2011. **40**(3): p. 354-65.
79. Dannenberg, H., et al., *Losses of chromosomes 1p and 3q are early genetic events in the development of sporadic pheochromocytomas*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 353-9.
80. Edstrom, E., et al., *Comparative genomic hybridization reveals frequent losses of chromosomes 1p and 3q in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas, suggesting a common genetic etiology*. Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 651-9.
81. Cascon, A., et al., *A novel candidate region linked to development of both pheochromocytoma and head/neck paraganglioma*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **42**(3): p. 260-8.
82. Sandgren, J., et al., *Recurrent genomic alterations in benign and malignant pheochromocytomas and paragangliomas revealed by whole-genome array comparative genomic hybridization analysis*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(3): p. 561-79.
83. Meyer-Rochow, G.Y., et al., *MicroRNA profiling of benign and malignant pheochromocytomas identifies novel diagnostic and therapeutic targets*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(3): p. 835-46.
84. Patterson, E., et al., *The microRNA expression changes associated with malignancy and SDHB mutation in pheochromocytoma*. Endocr Relat Cancer, 2012. **19**(2): p. 157-66.

85. de Cubas, A.A., et al., *Integrative analysis of miRNA and mRNA expression profiles in pheochromocytoma and paraganglioma identifies genotype-specific markers and potentially regulated pathways*. *Endocr Relat Cancer*, 2013. **20**(4): p. 477-93.
86. Waguespack, S.G., et al., *A current review of the etiology, diagnosis, and treatment of pediatric pheochromocytoma and paraganglioma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. **95**(5): p. 2023-37.
87. Adjalle, R., et al., *Treatment of malignant pheochromocytoma*. *Horm Metab Res*, 2009. **41**(9): p. 687-96.
88. Loh, K.C., et al., *The treatment of malignant pheochromocytoma with iodine-131 metaiodobenzylguanidine (131I-MIBG): a comprehensive review of 116 reported patients*. *J Endocrinol Invest*, 1997. **20**(11): p. 648-58.
89. Mukherjee, J.J., et al., *Treatment of metastatic carcinoid tumours, phaeochromocytoma, paraganglioma and medullary carcinoma of the thyroid with (131)I-metaiodobenzylguanidine [(131)I-MIBG]*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2001. **55**(1): p. 47-60.
90. Scholz, T., et al., *Clinical review: Current treatment of malignant pheochromocytoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(4): p. 1217-25.
91. Oberg, K.E., *The management of neuroendocrine tumours: current and future medical therapy options*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2012. **24**(4): p. 282-93.
92. Eisenhofer, G., et al., *Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress*. *Endocr Relat Cancer*, 2004. **11**(3): p. 423-36.
93. Nomura, K., et al., *Survival of patients with metastatic malignant pheochromocytoma and efficacy of combined cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine chemotherapy*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(8): p. 2850-6.
94. Chrisoulidou, A., et al., *The diagnosis and management of malignant phaeochromocytoma and paraganglioma*. *Endocr Relat Cancer*, 2007. **14**(3): p. 569-85.
95. Netterville, J.L., et al., *Vagal paraganglioma: a review of 46 patients treated during a 20-year period*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998. **124**(10): p. 1133-40.
96. Stehelin, D., et al., *DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA*. *Nature*, 1976. **260**(5547): p. 170-3.
97. Knudson, A.G., Jr., *Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm*. *Semin Oncol*, 1978. **5**(1): p. 57-60.
98. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(2): p. 157-62.
99. Knudson, A.G., Jr. and L.C. Strong, *Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma*. *Am J Hum Genet*, 1972. **24**(5): p. 514-32.
100. Burnichon, N., et al., *Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma*. *Hum Mol Genet*, 2012. **21**(26): p. 5397-405.
101. Burnichon, N., et al., *Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(20): p. 3974-85.
102. Pasmant, E., et al., *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. *J Med Genet*, 2012. **49**(8): p. 483-9.
103. Eichenfield, L.F., et al., *Guidelines of care for neurofibromatosis type 1. American Academy of Dermatology Guidelines/Outcomes Committee*. *J Am Acad Dermatol*, 1997. **37**(4): p. 625-30.
104. Lammert, M., et al., *Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment*. *Arch Dermatol*, 2005. **141**(1): p. 71-4.
105. Patil, S. and R.S. Chamberlain, *Neoplasms associated with germline and somatic NF1 gene mutations*. *Oncologist*, 2012. **17**(1): p. 101-16.
106. Friedman, J.M. and P.H. Birch, *Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients*. *Am J Med Genet*, 1997. **70**(2): p. 138-43.
107. Walther, M.M., et al., *von Recklinghausen's disease and pheochromocytomas*. *J Urol*, 1999. **162**(5): p. 1582-6.

108. Wallace, M.R., et al., *Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients*. Science, 1990. **249**(4965): p. 181-6.
109. White, R., D. Viskochil, and P. O'Connell, *Identification and characterization of the gene for neurofibromatosis type 1*. Curr Opin Neurobiol, 1991. **1**(3): p. 462-7.
110. Shen, M.H., P.S. Harper, and M. Upadhyaya, *Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1)*. J Med Genet, 1996. **33**(1): p. 2-17.
111. Huson, S.M., et al., *A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity*. J Med Genet, 1989. **26**(11): p. 704-11.
112. Kehrer-Sawatzki, H. and D.N. Cooper, *Mosaicism in sporadic neurofibromatosis type 1: variations on a theme common to other hereditary cancer syndromes?* J Med Genet, 2008. **45**(10): p. 622-31.
113. D'Angelo, I., et al., *A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein*. EMBO Rep, 2006. **7**(2): p. 174-9.
114. Thomas, L., et al., *Assessment of the potential pathogenicity of missense mutations identified in the GTPase-activating protein (GAP)-related domain of the neurofibromatosis type-1 (NF1) gene*. Hum Mutat, 2012. **33**(12): p. 1687-96.
115. Brossier, N.M. and S.L. Carroll, *Genetically engineered mouse models shed new light on the pathogenesis of neurofibromatosis type I-related neoplasms of the peripheral nervous system*. Brain Res Bull, 2012. **88**(1): p. 58-71.
116. Brandi, M.L., et al., *Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5658-71.
117. Hyer, S.L., K. Newbold, and C. Harmer, *Familial medullary thyroid cancer: clinical aspects and prognosis*. Eur J Surg Oncol, 2005. **31**(4): p. 415-9.
118. Nguyen, L., et al., *Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2: a prospective study*. Eur J Endocrinol, 2001. **144**(1): p. 37-44.
119. Mulligan, L.M., et al., *Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A*. Nature, 1993. **363**(6428): p. 458-60.
120. Machens, A., et al., *Codon-specific development of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(7): p. 3999-4003.
121. Wagner, S.M., et al., *Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2*. Clinics (Sao Paulo), 2012. **67 Suppl 1**: p. 77-84.
122. Ibanez, C.F., *Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).
123. Porter, A.C. and R.R. Vaillancourt, *Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1343-52.
124. American Thyroid Association Guidelines Task, F., et al., *Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association*. Thyroid, 2009. **19**(6): p. 565-612.
125. Richard, S., et al., *Von Hippel-Lindau disease*. Lancet, 2004. **363**(9416): p. 1231-4.
126. Maher, E.R., et al., *Von Hippel-Lindau disease: a genetic study*. J Med Genet, 1991. **28**(7): p. 443-7.
127. Hes, F., et al., *Genotype-phenotype correlations in families with deletions in the von Hippel-Lindau (VHL) gene*. Hum Genet, 2000. **106**(4): p. 425-31.
128. Nordstrom-O'Brien, M., et al., *Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease*. Hum Mutat, 2010. **31**(5): p. 521-37.
129. Lonser, R.R., et al., *von Hippel-Lindau disease*. Lancet, 2003. **361**(9374): p. 2059-67.
130. Maddock, I.R., et al., *A genetic register for von Hippel-Lindau disease*. J Med Genet, 1996. **33**(2): p. 120-7.
131. Manski, T.J., et al., *Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease*. Jama, 1997. **277**(18): p. 1461-6.

132. Latif, F., et al., *Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene*. Science, 1993. **260**(5112): p. 1317-20.
133. Barry, R.E. and W. Krek, *The von Hippel-Lindau tumour suppressor: a multi-faceted inhibitor of tumourigenesis*. Trends Mol Med, 2004. **10**(9): p. 466-72.
134. Satija, Y.K., A. Bhardwaj, and S. Das, *A portrayal of E3 ubiquitin ligases and deubiquitylases in cancer*. Int J Cancer, 2013. **133**(12): p. 2759-68.
135. Nyhan, M.J., G.C. O'Sullivan, and S.L. McKenna, *Role of the VHL (von Hippel-Lindau) gene in renal cancer: a multifunctional tumour suppressor*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 472-8.
136. Hergovich, A., et al., *Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(1): p. 64-70.
137. Kim, W.Y. and W.G. Kaelin, *Role of VHL gene mutation in human cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(24): p. 4991-5004.
138. Heutink, P., et al., *A gene subject to genomic imprinting and responsible for hereditary paragangliomas maps to chromosome 11q23-qter*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(1): p. 7-10.
139. Mariman, E.C., et al., *Analysis of a second family with hereditary non-chromaffin paragangliomas locates the underlying gene at the proximal region of chromosome 11q*. Hum Genet, 1993. **91**(4): p. 357-61.
140. Niemann, S., D. Steinberger, and U. Muller, *PGL3, a third, not maternally imprinted locus in autosomal dominant paraganglioma*. Neurogenetics, 1999. **2**(3): p. 167-70.
141. Bayley, J.P., P. Devilee, and P.E. Taschner, *The SDH mutation database: an online resource for succinate dehydrogenase sequence variants involved in pheochromocytoma, paraganglioma and mitochondrial complex II deficiency*. BMC Med Genet, 2005. **6**: p. 39.
142. Baysal, B.E., et al., *Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma*. Science, 2000. **287**(5454): p. 848-51.
143. Timmers, H.J., et al., *Mutations associated with succinate dehydrogenase D-related malignant paragangliomas*. Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **68**(4): p. 561-6.
144. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., *The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(6): p. 1186-97.
145. Niemann, S. and U. Muller, *Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3*. Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 268-70.
146. Schiavi, F., et al., *Predictors and prevalence of paraganglioma syndrome associated with mutations of the SDHC gene*. JAMA, 2005. **294**(16): p. 2057-63.
147. Mannelli, M., et al., *Genetic screening for pheochromocytoma: should SDHC gene analysis be included?* J Med Genet, 2007. **44**(9): p. 586-7.
148. Peczkowska, M., et al., *Extra-adrenal and adrenal pheochromocytomas associated with a germline SDHC mutation*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(2): p. 111-5.
149. Niemann, S., et al., *Autosomal dominant malignant and catecholamine-producing paraganglioma caused by a splice donor site mutation in SDHC*. Hum Genet, 2003. **113**(1): p. 92-4.
150. Astuti, D., et al., *Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(1): p. 49-54.
151. Ricketts, C.J., et al., *Tumor risks and genotype-phenotype-proteotype analysis in 358 patients with germline mutations in SDHB and SDHD*. Hum Mutat, 2010. **31**(1): p. 41-51.
152. Cascon, A., et al., *Molecular characterisation of a common SDHB deletion in paraganglioma patients*. J Med Genet, 2008. **45**(4): p. 233-8.
153. Srirangalingam, U., et al., *Clinical manifestations of familial paraganglioma and phaeochromocytomas in succinate dehydrogenase B (SDH-B) gene mutation carriers*. Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **69**(4): p. 587-96.

154. Pasini, B. and C.A. Stratakis, *SDH mutations in tumorigenesis and inherited endocrine tumours: lesson from the pheochromocytoma-paranglioma syndromes*. J Intern Med, 2009. **266**(1): p. 19-42.
155. Hao, H.X., et al., *SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma*. Science, 2009. **325**(5944): p. 1139-42.
156. Bayley, J.P., et al., *SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and pheochromocytoma*. Lancet Oncol, 2010. **11**(4): p. 366-72.
157. Horvath, R., et al., *Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein (Fp) subunit of succinate dehydrogenase (SDHA)*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006. **77**(1): p. 74-6.
158. Burnichon, N., et al., *SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(15): p. 3011-20.
159. Nishida, T., et al., *Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 323-4.
160. Chompret, A., et al., *PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 318-21.
161. McWhinney, S.R., et al., *Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations*. N Engl J Med, 2007. **357**(10): p. 1054-6.
162. Pasini, B., et al., *Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(1): p. 79-88.
163. Stratakis, C.A. and J.A. Carney, *The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications*. J Intern Med, 2009. **266**(1): p. 43-52.
164. Janeway, K.A., et al., *Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(1): p. 314-8.
165. Oudijk, L., et al., *SDHA mutations in adult and pediatric wild-type gastrointestinal stromal tumors*. Mod Pathol, 2013. **26**(3): p. 456-63.
166. Pantaleo, M.A., et al., *Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFRA wild-type GIST*. Eur J Hum Genet, 2014. **22**(1): p. 32-9.
167. Wagner, A.J., et al., *Loss of expression of SDHA predicts SDHA mutations in gastrointestinal stromal tumors*. Mod Pathol, 2013. **26**(2): p. 289-94.
168. Neumann, H.P., et al., *Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations*. Jama, 2004. **292**(8): p. 943-51.
169. Vanharanta, S., et al., *Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparanglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(1): p. 153-9.
170. Ricketts, C., et al., *Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(17): p. 1260-2.
171. Malinoc, A., et al., *Biallelic inactivation of the SDHC gene in renal carcinoma associated with paraganglioma syndrome type 3*. Endocr Relat Cancer, 2012. **19**(3): p. 283-90.
172. Ricketts, C.J., et al., *Succinate dehydrogenase kidney cancer: an aggressive example of the Warburg effect in cancer*. J Urol, 2012. **188**(6): p. 2063-71.
173. Dwight, T., et al., *Familial SDHA mutation associated with pituitary adenoma and pheochromocytoma/paraganglioma*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(6): p. E1103-8.
174. Lopez-Jimenez, E., et al., *SDHC mutation in an elderly patient without familial antecedents*. Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **69**(6): p. 906-10.
175. Xekouki, P., et al., *Succinate dehydrogenase (SDH) D subunit (SDHD) inactivation in a growth-hormone-producing pituitary tumor: a new association for SDH?* J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(3): p. E357-66.

176. Zbuk, K.M., et al., *Germline mutations in PTEN and SDHC in a woman with epithelial thyroid cancer and carotid paraganglioma*. Nat Clin Pract Oncol, 2007. **4**(10): p. 608-12.
177. Bardella, C., P.J. Pollard, and I. Tomlinson, *SDH mutations in cancer*. Biochim Biophys Acta. **1807**(11): p. 1432-43.
178. Cao, Z., et al., *Analysis of succinate dehydrogenase subunit B gene alterations in gastric cancers*. Pathol Int, 2010. **60**(8): p. 559-65.
179. Armstrong, R., et al., *Succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) gene deletion associated with a composite paraganglioma/neuroblastoma*. J Med Genet, 2009. **46**(3): p. 215-6.
180. Schimke, R.N., D.L. Collins, and C.A. Stolle, *Paraganglioma, neuroblastoma, and a SDHB mutation: Resolution of a 30-year-old mystery*. Am J Med Genet A, 2010. **152A**(6): p. 1531-5.
181. Grogan, R.H., et al., *Bilateral adrenal medullary hyperplasia associated with an SDHB mutation*. J Clin Oncol, 2011. **29**(8): p. e200-2.
182. Zantour, B., et al., *A thyroid nodule revealing a paraganglioma in a patient with a new germline mutation in the succinate dehydrogenase B gene*. Eur J Endocrinol, 2004. **151**(4): p. 433-8.
183. Astuti, D., et al., *Investigation of the role of SDHB inactivation in sporadic pheochromocytoma and neuroblastoma*. Br J Cancer, 2004. **91**(10): p. 1835-41.
184. Grau, E., et al., *There is no evidence that the SDHB gene is involved in neuroblastoma development*. Oncol Res, 2005. **15**(7-8): p. 393-8.
185. Hederstedt, L. and L. Rutberg, *Succinate dehydrogenase--a comparative review*. Microbiol Rev, 1981. **45**(4): p. 542-55.
186. Rutter, J., D.R. Winge, and J.D. Schiffman, *Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease*. Mitochondrion, 2010. **10**(4): p. 393-401.
187. Bayley, J.P., V. Launonen, and I.P. Tomlinson, *The FH mutation database: an online database of fumarate hydratase mutations involved in the MCUL (HLRCC) tumor syndrome and congenital fumarase deficiency*. BMC Med Genet, 2008. **9**: p. 20.
188. Bourgeron, T., et al., *Mutation of the fumarase gene in two siblings with progressive encephalopathy and fumarase deficiency*. J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2514-8.
189. Tomlinson, I.P., et al., *Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 406-10.
190. Alam, N.A., et al., *Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(11): p. 1241-52.
191. Lehtonen, H.J., et al., *Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation*. J Med Genet, 2006. **43**(6): p. 523-6.
192. Yang, M., T. Soga, and P.J. Pollard, *Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer*. J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 3652-8.
193. Letouze, E., et al., *SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma*. Cancer Cell, 2013. **23**(6): p. 739-52.
194. Castro-Vega, L.J., et al., *Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas*. Hum Mol Genet, 2013.
195. Yorgev, O., A. Naamati, and O. Pines, *Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions*. FEBS J, 2011. **278**(22): p. 4230-42.
196. Adam, J., et al., *A role for cytosolic fumarate hydratase in urea cycle metabolism and renal neoplasia*. Cell Rep, 2013. **3**(5): p. 1440-8.
197. Qin, Y., et al., *Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma*. Nat Genet, 2010. **42**(3): p. 229-33.
198. Abermil, N., et al., *TMEM127 screening in a large cohort of patients with pheochromocytoma and/or paraganglioma*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(5): p. E805-9.
199. Comino-Mendez, I., et al., *Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma*. Nat Genet, 2011. **43**(7): p. 663-7.

200. Burnichon, N., et al., *MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(10): p. 2828-37.
201. Jiang, S. and P.L. Dahia, *Minireview: the busy road to pheochromocytomas and paragangliomas has a new member, TMEM127*. Endocrinology, 2011. **152**(6): p. 2133-40.
202. Qin, Y., et al., *The tumor susceptibility gene TMEM127 is mutated in renal cell carcinomas and modulates endolysosomal function*. Hum Mol Genet, 2013.
203. Cascon, A. and M. Robledo, *MAX and MYC: a heritable breakup*. Cancer Res, 2012. **72**(13): p. 3119-24.
204. Schlisio, S., et al., *The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from Egln3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor*. Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 884-93.
205. Yeh, I.T., et al., *A germline mutation of the KIF1B beta gene on 1p36 in a family with neural and nonneural tumors*. Hum Genet, 2008. **124**(3): p. 279-85.
206. Welander, J., et al., *Rare germline mutations identified by targeted next-generation sequencing of susceptibility genes in pheochromocytoma and paraganglioma*. J Clin Endocrinol Metab, 2014: p. jc20134375.
207. Ladroue, C., et al., *PHD2 mutation and congenital erythrocytosis with paraganglioma*. N Engl J Med, 2008. **359**(25): p. 2685-92.
208. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
209. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
210. Mardis, E.R., et al., *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome*. N Engl J Med, 2009. **361**(11): p. 1058-66.
211. Amary, M.F., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours*. J Pathol, 2011. **224**(3): p. 334-43.
212. Borger, D.R., et al., *Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping*. Oncologist, 2012. **17**(1): p. 72-9.
213. Murugan, A.K., E. Bojdani, and M. Xing, *Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(3): p. 555-9.
214. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. Nature, 2009. **462**(7274): p. 739-44.
215. Ward, P.S., et al., *The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate*. Cancer Cell, 2010. **17**(3): p. 225-34.
216. Gaal, J., et al., *Isocitrate dehydrogenase mutations are rare in pheochromocytomas and paragangliomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(3): p. 1274-8.
217. Zhuang, Z., et al., *Somatic HIF2A gain-of-function mutations in paraganglioma with polycythemia*. N Engl J Med, 2012. **367**(10): p. 922-30.
218. Comino-Mendez, I., et al., *Tumoral EPAS1 (HIF2A) mutations explain sporadic pheochromocytoma and paraganglioma in the absence of erythrocytosis*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(11): p. 2169-76.
219. Favier, J., A. Buffet, and A.P. Gimenez-Roqueplo, *HIF2A mutations in paraganglioma with polycythemia*. N Engl J Med, 2012. **367**(22): p. 2161; author reply 2161-2.
220. Buffet, A., et al., *Mosaicism in HIF2A-related polycythemia-paraganglioma syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2013.
221. Crona, J., et al., *Somatic mutations in H-RAS in sporadic pheochromocytoma and paraganglioma identified by exome sequencing*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(7): p. E1266-71.

222. Oudijk, L., et al., *H-RAS mutations are restricted to sporadic pheochromocytomas lacking specific clinical or pathological features: data from a multi-institutional series*. J Clin Endocrinol Metab, 2014: p. jc20133879.
223. Jafri, M. and E.R. Maher, *The genetics of phaeochromocytoma: using clinical features to guide genetic testing*. Eur J Endocrinol, 2012. **166**(2): p. 151-8.
224. van Nederveen, F.H., et al., *An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and phaeochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis*. Lancet Oncol, 2009. **10**(8): p. 764-71.
225. Korpershoek, E., et al., *SDHA immunohistochemistry detects germline SDHA gene mutations in apparently sporadic paragangliomas and pheochromocytomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(9): p. E1472-6.
226. Amar, L., et al., *Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8812-8.
227. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., *Phaeochromocytoma, new genes and screening strategies*. Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **65**(6): p. 699-705.
228. Favier, J. and A.P. Gimenez-Roqueplo, *[Genetics of paragangliomas and pheochromocytomas]*. Med Sci (Paris), 2012. **28**(6-7): p. 625-32.
229. Dahia, P.L., et al., *A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas*. PLoS Genet, 2005. **1**(1): p. 72-80.
230. Eisenhofer, G., et al., *Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome*. Endocr Relat Cancer, 2004. **11**(4): p. 897-911.
231. Lopez-Jimenez, E., et al., *Research resource: Transcriptional profiling reveals different pseudohypoxic signatures in SDHB and VHL-related pheochromocytomas*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(12): p. 2382-91.
232. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
233. Favier, J. and A.P. Gimenez-Roqueplo, *Pheochromocytomas: the (pseudo)-hypoxia hypothesis*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010. **24**(6): p. 957-68.
234. Nikiforov, Y.E. and M.N. Nikiforova, *Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(10): p. 569-80.
235. Yohay, K.H., *The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2*. Semin Pediatr Neurol, 2006. **13**(1): p. 21-6.
236. Dang, C.V., *MYC on the path to cancer*. Cell, 2012. **149**(1): p. 22-35.
237. Bishop, T., et al., *Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3-/- mice*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3386-400.
238. Lee, S., et al., *Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer*. Cancer Cell, 2005. **8**(2): p. 155-67.
239. Jimenez, C., et al., *Use of the tyrosine kinase inhibitor sunitinib in a patient with von Hippel-Lindau disease: targeting angiogenic factors in pheochromocytoma and other von Hippel-Lindau disease-related tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(2): p. 386-91.
240. Joshua, A.M., et al., *Rationale and evidence for sunitinib in the treatment of malignant paraganglioma/pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 5-9.
241. Gross, D.J., et al., *The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(2): p. 535-40.
242. Kulke, M.H., et al., *Phase II study of temozolomide and thalidomide in patients with metastatic neuroendocrine tumors*. J Clin Oncol, 2006. **24**(3): p. 401-6.
243. Hadoux, J., et al., *SDHB mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or paraganglioma*. Int J Cancer, 2014.

244. Ayala-Ramirez, M., et al., *Treatment with sunitinib for patients with progressive metastatic pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(11): p. 4040-50.
245. Druce, M.R., et al., *Novel and evolving therapies in the treatment of malignant pheochromocytoma: experience with the mTOR inhibitor everolimus (RAD001)*. Horm Metab Res, 2009. **41**(9): p. 697-702.
246. Oh, D.Y., et al., *Phase 2 study of everolimus monotherapy in patients with nonfunctioning neuroendocrine tumors or pheochromocytomas/paragangliomas*. Cancer, 2012. **118**(24): p. 6162-70.
247. Sausville, E.A., J.E. Tomaszewski, and P. Ivy, *Clinical development of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin*. Curr Cancer Drug Targets, 2003. **3**(5): p. 377-83.
248. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., *Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(10): p. 4771-4.
249. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., *Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas*. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5615-21.
250. Benn, D.E., et al., *Sporadic and familial pheochromocytomas are associated with loss of at least two discrete intervals on chromosome 1p*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 7048-51.
251. Amar, L., et al., *Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(10): p. 3822-8.
252. King, K.S., et al., *Metastatic pheochromocytoma/paraganglioma related to primary tumor development in childhood or adolescence: significant link to SDHB mutations*. J Clin Oncol, 2011. **29**(31): p. 4137-42.
253. van Hulsteijn, L.T., et al., *Risk of malignant paraganglioma in SDHB-mutation and SDHD-mutation carriers: a systematic review and meta-analysis*. J Med Genet, 2012. **49**(12): p. 768-76.
254. Brouwers, F.M., et al., *High frequency of SDHB germline mutations in patients with malignant catecholamine-producing paragangliomas: implications for genetic testing*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4505-9.
255. Boedeker, C.C., et al., *Malignant head and neck paragangliomas in SDHB mutation carriers*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. **137**(1): p. 126-9.
256. Burnichon, N., et al., *The succinate dehydrogenase genetic testing in a large prospective series of patients with paragangliomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(8): p. 2817-27.
257. Benn, D.E., et al., *Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(3): p. 827-36.
258. Timmers, H.J., et al., *Clinical presentations, biochemical phenotypes, and genotype-phenotype correlations in patients with succinate dehydrogenase subunit B-associated pheochromocytomas and paragangliomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 779-86.
259. Timmers, H.J., et al., *Comparison of 18F-fluoro-L-DOPA, 18F-fluoro-deoxyglucose, and 18F-fluorodopamine PET and 123I-MIBG scintigraphy in the localization of pheochromocytoma and paraganglioma*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(12): p. 4757-67.
260. Timmers, H.J., et al., *Staging and functional characterization of pheochromocytoma and paraganglioma by 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) positron emission tomography*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(9): p. 700-8.
261. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 333-9.
262. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
263. Le Douarin, N.M., *Cell migrations in embryos*. Cell, 1984. **38**(2): p. 353-60.
264. Thiery, J.P., et al., *[Epithelial mesenchymal transition during development in fibrosis and in the progression of carcinoma]*. Bull Cancer, 2010. **97**(11): p. 1285-95.

265. Wolpert, L. and C. Tickle, *Principles of Development*. 2010: Oxford University Press, USA.
266. Bronner-Fraser, M., *Neural crest cell formation and migration in the developing embryo*. FASEB J, 1994. **8**(10): p. 699-706.
267. Lallier, T.E., *Cell lineage and cell migration in the neural crest*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **615**: p. 158-71.
268. Lim, J. and J.P. Thiery, *Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development*. Development, 2012. **139**(19): p. 3471-86.
269. Maroto, M., R.A. Bone, and J.K. Dale, *Somitogenesis*. Development, 2012. **139**(14): p. 2453-6.
270. Nakaya, Y., et al., *Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1*. Dev Cell, 2004. **7**(3): p. 425-38.
271. Nakajima, Y., et al., *Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP)*. Anat Rec, 2000. **258**(2): p. 119-27.
272. Zhan, Y., et al., *Mullerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Mullerian duct regression*. Development, 2006. **133**(12): p. 2359-69.
273. Roberts, L.M., et al., *Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development*. Dev Biol, 1999. **208**(1): p. 110-22.
274. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 75-81.
275. Arnoux, V., et al., *Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(11): p. 4738-49.
276. Segre, J.A., *Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1150-8.
277. Ahmed, N., et al., *Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(6): p. C1532-42.
278. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 255-88.
279. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
280. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
281. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
282. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
283. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
284. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
285. Kang, Y. and J. Massague, *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. Cell, 2004. **118**(3): p. 277-9.
286. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
287. Imai, T., et al., *Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells*. Am J Pathol, 2003. **163**(4): p. 1437-47.
288. Luo, D., et al., *Mouse snail is a target gene for HIF*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(2): p. 234-45.
289. Yang, M.H. and K.J. Wu, *TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development*. Cell Cycle, 2008. **7**(14): p. 2090-6.
290. Yang, M.H., et al., *Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 295-305.

291. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
292. Alberga, A., et al., *The snail gene required for mesoderm formation in Drosophila is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers*. Development, 1991. **111**(4): p. 983-92.
293. Batlle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
294. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
295. Molina-Ortiz, P., et al., *Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36132.
296. Villarejo, A., et al., *Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 930-41.
297. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 155-66.
298. Dominguez, D., et al., *Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(14): p. 5078-89.
299. Zhou, B.P., et al., *Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(10): p. 931-40.
300. Peinado, H., et al., *A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression*. EMBO J, 2005. **24**(19): p. 3446-58.
301. Ko, H., et al., *Nuclear localization signals of the E-cadherin transcriptional repressor Snail*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 66-72.
302. Yamasaki, H., et al., *Zinc finger domain of Snail functions as a nuclear localization signal for importin beta-mediated nuclear import pathway*. Genes Cells, 2005. **10**(5): p. 455-64.
303. Mingot, J.M., et al., *Characterization of Snail nuclear import pathways as representatives of C2H2 zinc finger transcription factors*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 9): p. 1452-60.
304. Grattan, B.J. and H.C. Freake, *Zinc and cancer: implications for LIV-1 in breast cancer*. Nutrients, 2012. **4**(7): p. 648-75.
305. Yamashita, S., et al., *Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer*. Nature, 2004. **429**(6989): p. 298-302.
306. Unno, J., et al., *LIV-1 enhances the aggressive phenotype through the induction of epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells*. Int J Oncol, 2009. **35**(4): p. 813-21.
307. Yang, Z., et al., *Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3179-84.
308. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta*. Cell Cycle, 2005. **4**(12): p. 1749-52.
309. Pon, Y.L., et al., *p70 S6 kinase promotes epithelial to mesenchymal transition through snail induction in ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6524-32.
310. MacPherson, M.R., et al., *Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(2): p. 244-53.
311. Zhang, K., et al., *Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation*. EMBO J, 2012. **31**(1): p. 29-43.
312. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 73-84.
313. Wu, Y., B.M. Evers, and B.P. Zhou, *Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 640-8.
314. Vinas-Castells, R., et al., *The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3794-805.

315. Du, C., et al., *Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail*. *Cancer Res*, 2010. **70**(20): p. 7810-9.
316. Wu, Y., et al., *Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(5): p. 416-28.
317. Kim, J.Y., et al., *Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3beta-mediated phosphorylation*. *FEBS J*, 2012. **279**(16): p. 2929-39.
318. Wang, S.P., et al., *p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(6): p. 694-704.
319. Browne, G., A.E. Sayan, and E. Tulchinsky, *ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(5): p. 886-91.
320. Eger, A., et al., *DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(14): p. 2375-85.
321. Guaita, S., et al., *Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39209-16.
322. Comijn, J., et al., *The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion*. *Mol Cell*, 2001. **7**(6): p. 1267-78.
323. Vandewalle, C., F. Van Roy, and G. Berx, *The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(5): p. 773-87.
324. Costantino, M.E., et al., *Cell-specific phosphorylation of Zfh1 transcription factor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **296**(2): p. 368-73.
325. Long, J., D. Zuo, and M. Park, *Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(42): p. 35477-89.
326. Zhao, L.J., T. Subramanian, and G. Chinnadurai, *Changes in C-terminal binding protein 2 (CtBP2) corepressor complex induced by E1A and modulation of E1A transcriptional activity by CtBP2*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(48): p. 36613-23.
327. Hong, J., et al., *Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness*. *Cancer Res*, 2011. **71**(11): p. 3980-90.
328. Peinado, H., et al., *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(1): p. 306-19.
329. Dong, C., et al., *G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(4): p. 1469-86.
330. Cedar, H. and Y. Bergman, *Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(5): p. 295-304.
331. Herranz, N., et al., *Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(15): p. 4772-81.
332. Tong, Z.T., et al., *EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin*. *Oncogene*, 2012. **31**(5): p. 583-94.
333. Lin, T., et al., *Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition*. *Oncogene*, 2010. **29**(35): p. 4896-904.
334. Wang, J., et al., *Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes*. *Nature*, 2007. **446**(7138): p. 882-7.
335. Sanchez-Tillo, E., et al., *ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1*. *Oncogene*, 2010. **29**(24): p. 3490-500.
336. Yang, M.H., et al., *Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(10): p. 982-92.
337. Yang, F., et al., *SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities*. *EMBO J*, 2012. **31**(1): p. 110-23.
338. Fu, J., et al., *The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis*. *Cell Res*, 2011. **21**(2): p. 275-89.

339. Ansieau, S., et al., *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence*. Cancer Cell, 2008. **14**(1): p. 79-89.
340. Tam, W.L. and R.A. Weinberg, *The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1438-49.
341. De Craene, B., et al., *The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6237-44.
342. De Craene, B. and G. Berx, *Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 97-110.
343. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell, 2004. **117**(7): p. 927-39.
344. Savagner, P., K.M. Yamada, and J.P. Thiery, *The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Biol, 1997. **137**(6): p. 1403-19.
345. Vega, S., et al., *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes Dev, 2004. **18**(10): p. 1131-43.
346. Emadi Baygi, M., et al., *Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines*. Cell Biol Toxicol, 2010. **26**(6): p. 553-67.
347. Olmeda, D., et al., *Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness*. Oncogene, 2007. **26**(13): p. 1862-74.
348. Moody, S.E., et al., *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 197-209.
349. Muenst, S., et al., *Nuclear expression of snail is an independent negative prognostic factor in human breast cancer*. Dis Markers, 2013. **35**(5): p. 337-44.
350. Shin, N.R., et al., *Overexpression of Snail is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 521.
351. Buehler, D., et al., *Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators SNAI2 and TWIST1 in thyroid carcinomas*. Mod Pathol, 2013. **26**(1): p. 54-61.
352. Kroepil, F., et al., *Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 145.
353. Miyoshi, A., et al., *Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma*. Br J Cancer, 2005. **92**(2): p. 252-8.
354. Waldmann, J., et al., *Expression of the zinc-finger transcription factor Snail in adrenocortical carcinoma is associated with decreased survival*. Br J Cancer, 2008. **99**(11): p. 1900-7.
355. Rosivatz, E., et al., *Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract*. Virchows Arch, 2006. **448**(3): p. 277-87.
356. Nomura, S., et al., *Snail expression and outcome in T1 high-grade and T2 bladder cancer: a retrospective immunohistochemical analysis*. BMC Urol, 2013. **13**: p. 73.
357. Jouppila-Matto, A., et al., *Twist and snai1 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma stroma is related to cancer progression*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 350.
358. Reymond, N., B.B. d'Agua, and A.J. Ridley, *Crossing the endothelial barrier during metastasis*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(12): p. 858-70.
359. Huang, R.Y., P. Guilford, and J.P. Thiery, *Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 19): p. 4417-22.
360. Capaldo, C.T., A.E. Farkas, and A. Nusrat, *Epithelial adhesive junctions*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 1.
361. Le Bras, G.F., K.J. Taubenslag, and C.D. Andl, *The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(4): p. 365-73.
362. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.

363. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
364. Tsai, J.H., et al., *Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis*. Cancer Cell, 2012. **22**(6): p. 725-36.
365. Ocana, O.H., et al., *Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1*. Cancer Cell, 2012. **22**(6): p. 709-24.
366. Carstens, J.L., S. Lovisa, and R. Kalluri, *Microenvironment-dependent cues trigger miRNA-regulated feedback loop to facilitate the EMT/MET switch*. J Clin Invest, 2014. **124**(4): p. 1458-60.
367. Plouin, P.F., A.P. Gimenez-Roqueplo, and X. Bertagna, *[COMETE, a network for the study and management of hypersecreting adrenal tumors]*. Bull Acad Natl Med, 2008. **192**(1): p. 73-82; discussion 83-5.
368. Favier, J., et al., *The warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7094.
369. Galvan, J.A., et al., *Epithelial-mesenchymal transition markers in the differential diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Am J Clin Pathol, 2013. **140**(1): p. 61-72.
370. Fendrich, V., et al., *Epithelial-mesenchymal transition is a critical step in tumorigenesis of pancreatic neuroendocrine tumors*. Cancers (Basel), 2012. **4**(1): p. 281-94.
371. Speisky, D., et al., *Molecular profiling of pancreatic neuroendocrine tumors in sporadic and Von Hippel-Lindau patients*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(10): p. 2838-49.
372. Gebert, N., et al., *Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane*. Mol Cell, 2011. **44**(5): p. 811-8.
373. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
374. Briere, J.J., et al., *Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1alpha nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(21): p. 3263-9.
375. Isaacs, J.S., et al., *HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability*. Cancer Cell, 2005. **8**(2): p. 143-53.
376. Selak, M.A., et al., *Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase*. Cancer Cell, 2005. **7**(1): p. 77-85.
377. Xiao, M., et al., *Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors*. Genes Dev, 2012. **26**(12): p. 1326-38.
378. Zhao, S., et al., *Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha*. Science, 2009. **324**(5924): p. 261-5.
379. Cervera, A.M., et al., *Inhibition of succinate dehydrogenase dysregulates histone modification in mammalian cells*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 89.
380. Turcan, S., et al., *IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 479-83.
381. Figueroa, M.E., et al., *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation*. Cancer Cell. **18**(6): p. 553-67.
382. Smith-Hicks, C.L., et al., *C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B*. EMBO J, 2000. **19**(4): p. 612-22.
383. Jacks, T., et al., *Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1*. Nat Genet, 1994. **7**(3): p. 353-61.
384. Lai, E.W., et al., *ErbB-2 induces bilateral adrenal pheochromocytoma formation in mice*. Cell Cycle, 2007. **6**(15): p. 1946-50.
385. You, M.J., et al., *Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1455-60.

386. Korpershoek, E., et al., *Conditional Pten knock-out mice: a model for metastatic pheochromocytoma*. J Pathol, 2009. **217**(4): p. 597-604.
387. Schulz, N., et al., *Pheochromocytomas and C-cell thyroid neoplasms in transgenic c-mos mice: a model for the human multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome*. Cancer Res, 1992. **52**(2): p. 450-5.
388. Ortega-Saenz, P., et al., *Mechanisms of acute oxygen sensing by the carotid body: lessons from genetically modified animals*. Respir Physiol Neurobiol, 2007. **157**(1): p. 140-7.
389. Gnarr, J.R., et al., *Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9102-7.
390. Ma, W., et al., *Hepatic vascular tumors, angiectasis in multiple organs, and impaired spermatogenesis in mice with conditional inactivation of the VHL gene*. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5320-8.
391. Haase, V.H., et al., *Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1583-8.
392. Ghayee, H.K., et al., *Progenitor cell line (hPheo1) derived from a human pheochromocytoma tumor*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65624.
393. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
394. Powers, J.F., et al., *Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice*. Cell Tissue Res, 2000. **302**(3): p. 309-20.
395. Martiniova, L., et al., *Characterization of an animal model of aggressive metastatic pheochromocytoma linked to a specific gene signature*. Clin Exp Metastasis, 2009. **26**(3): p. 239-50.
396. Killian, J.K., et al., *Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor*. Cancer Discov, 2013. **3**(6): p. 648-57.
397. Schweizer, J., et al., *New consensus nomenclature for mammalian keratins*. J Cell Biol, 2006. **174**(2): p. 169-74.
398. Seltmann, K., et al., *Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(1): p. 181-90.
399. Androulakis, N., et al., *Clinical relevance of circulating CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(12): p. 1917-25.
400. Crowe, D.L., G.E. Milo, and C.F. Shuler, *Keratin 19 downregulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential*. J Dent Res, 1999. **78**(6): p. 1256-63.
401. Caren, H., et al., *Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 66.
402. Nozato, M., et al., *Epithelial-mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma*. Int J Oncol, 2013. **42**(1): p. 134-40.
403. Morris, M.R., et al., *Functional epigenomics approach to identify methylated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma*. Br J Cancer, 2008. **98**(2): p. 496-501.
404. Ju, J.H., et al., *Regulation of cell proliferation and migration by keratin19-induced nuclear import of early growth response-1 in breast cancer cells*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(16): p. 4335-46.
405. Tripathi, M.K., S. Misra, and G. Chaudhuri, *Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(2): p. 508-15.
406. Navarro, A., et al., *Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33284.
407. Paiva, F., et al., *Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms*. DNA Cell Biol, 2011. **30**(2): p. 85-90.

- 408. Chi, S., et al., *Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells*. *Oncogene*, 1999. **18**(13): p. 2281-90.
- 409. Overmeyer, J.H., et al., *Active ras triggers death in glioblastoma cells through hyperstimulation of macropinocytosis*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(6): p. 965-77.
- 410. Overmeyer, J.H. and W.A. Maltese, *Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011. **16**: p. 1693-713.
- 411. Overmeyer, J.H., et al., *A chalcone-related small molecule that induces methuosis, a novel form of non-apoptotic cell death, in glioblastoma cells*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 69.
- 412. Mercer, J. and A. Helenius, *Virus entry by macropinocytosis*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(5): p. 510-20.